

MTA Doktori értekezés

A nemtenyésztéses diverzitáselemző molekuláris eljárások haszna
a környezeti bakteriológiában

Márialigeti Károly

Eötvös Loránd Tudományegyetem,
Természettudományi Kar, Biológiai Intézet,
Mikrobiológiai Tanszék,
Budapest,
2008.

TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	7
II.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
II.1.	A mikrobiális diverzitás fogalma és forrásai	9
II.2.	Rendszertani alapok. A fajfogalom a mikrobiológiában	14
II.2.1.	A bakteriológiai fajdefiníciók	16
II.3.	Környezeti bakteriológiai vizsgáló módszerek áttekintése	22
II.3.1.	A nukleinsav kivonáson alapuló környezeti bakteriológiai eljárások	27
II.3.1.1.	Nukleinsav kivonás	27
II.3.1.2.	Nukleinsav szaporítás, PCR	30
II.3.1.3.	Klónozás	33
II.3.1.4.	Bázissorrend elemzés	35
II.3.1.5.	Molekuláris ujjlenyomat eljárások	37
II.3.2.	A baktériumsejtek lipid összetevőinek kivonásán alapuló környezeti bakteriológiai eljárások	41
II.3.3.	Az oligonukleotid hibridizációs eljárások haszna a környezeti mikrobiológiában	42
III.	A KUTATÁSOK CÉLKITŰZÉSEI	47
IV.	ANYAG ÉS MÓDSZER	49
IV.1.	Mintavétel	49
IV.1.1.	Mintavétel az Óhalászi-Holt-Tiszán	49
IV.1.2.	Mintavétel a szigetcsépi úszólápon	49
IV.1.3.	Mintavételek a Fővárosi Csatornázási Művek Dél-pesti Szennyvíztisztító Telepén	51
IV.1.4.	Nagy NH ₃ terhelésű nitrifikáló szennyvíztisztító modell rendszer	51
IV.1.5.	Mintavétel a Fővárosi Vízművek északi vízbázisán	53
IV.1.6.	Mintavétel a demjéni mesterséges "pangó vizes" szennyvíztisztítón	54
IV.1.7.	Mintavétel a kiskunsági szikes tavakból	54
IV.2.	Fizikai-kémiai változók mérése a laboratóriumban	54
IV.3.	Tenyésztésen alapuló mikrobiológiai vizsgálatok	55
IV.3.1.	Csíraszámbecslési eljárások	56
IV.3.1.1.	Határhígítási módszerek (MPN - most probable number)	56
IV.3.1.2.	Szélesztési módszerek	56
IV.3.2.	Tisztítás, törzsfenntartás, autentikus (típus) törzsek	57
IV.3.3.	Telep- és sejtmorfológiai, valamint mikromorfológiai vizsgálatok	57
IV.3.4.	A törzsek biokémiai - élettani jellemzése	57
IV.3.5.	A törzsek kemotaxonómiai karakterizálása	58
IV.3.5.1.	Sejtfaljellemzők elemzése	58
IV.3.5.2.	Kinon mintázat elemzés	58
IV.3.5.3.	Zsírsavprofil elemzés	58
IV.3.5.4.	G + C molarány meghatározása és DNS - DNS hibridizáció	58
IV.3.5.5.	Törzsidentifikáció a polifázikus elv szem előtt tartásával	58
IV.3.6.	16S rDNS bázissorrend elemzés és az eredmény filogenetikai értékelése	58
IV.3.6.1.	DNS kivonása és tisztítása baktériumtörzsekből	58
IV.3.6.2.	16S rDNS konszenzus PCR	59
IV.3.6.3.	Bázissorrend elemzés és filospéciesz identifikáció	59
IV.4.	Nemtenyésztési mikrobiológiai vizsgáló módszerek	60
IV.4.1.	Sejtszám és biomassza meghatározása	60
IV.4.2.	Közösségi ATP mennyiség mérése	60

IV.4.3.	Környezeti nukleinsav kivonáson alapuló eljárások	60
IV.4.3.1.	DNS kivonás környezeti mintákból	60
IV.4.3.2.	RNS kivonás környezeti mintákból	60
IV.4.3.3.	Konszenzus PCR technikák	64
IV.4.3.4.	Reverz transzkripció	64
IV.4.3.5.	DGGE	64
IV.4.3.6.	T-RFLP	65
IV.4.3.7.	A multitemplát PCR torzításának elemzésében alkalmazott eljárások	65
IV.4.3.8.	Klónozás és klónkönyvtárak létrehozása	65
IV.4.3.9.	ARDRA	66
IV.4.3.10.	Bázissorrend elemzés és filospécies meghatározása	66
IV.4.4.	Környezeti minták lipidkivonáson alapuló elemzési módszerei	66
IV.4.4.1.	Foszfolipid foszfát alapú biomassza meghatározás	66
IV.4.4.2.	Kinon profil elemzés	67
IV.4.4.3.	Zsírsav metilészter mintázat elemzése	67
IV.5.	Adatértékelési eljárások	67
V.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	69
V.1.	A tenyésztéses, csíraszámolásra alapuló eljárások használata és korlátai a (víz)mikrobiológiában	69
V.2.	Törzsek vizsgálatán (tenyésztés, izolálás) alapuló eljárások eredményeinek összevetése a teljes nukleinsav kivonásra épülő diverzitásvizsgálat eredményeivel	80
V.3.	A molekuláris ujjlenyomat eljárások használata az alkalmazott bakteriológiában	99
V.3.1.	Szennyvíziszap rothasztó mikróbaközösségének elemzése a gáztermelés szempontjából optimális üzemi hőmérséklet megállapítására	100
V.3.2.	Filogenetikai információval rendelkező funkciógének alkalmazása nitrifikáció vizsgálatában	115
V.3.3.	A parti szűrésben résztvevő mikróbaközösségek elemzése molekuláris ujjlenyomat eljárások segítségével	121
V.4.	A nemtenyésztéses eljárások hibaforrásai	131
V.4.1.	A primerhibák, a hibridizációs hőfok és a PCR ciklusszám hatása a 16 / 18S rRNS génre alapozott bakteriális közösség elemzésekben	131
V.4.2.	A denaturáló gradiens gélelektroforézis molekuláris ujjlenyomat módszer hiányosságainak elemzése	140
V.5.	Polifázikus fajleírás: <i>Bacillus aurantiacus</i> sp. nov.	145
VI.	AZ ELÉRT EREDMÉNYEK ÖSSZEGZŐ MEGBESZÉLÉSE	153
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS	163
VIII.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	165
IX.	IRODALOMJEGYZÉK	167

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

„...Érezni, hogy gondoskodnak felőlünk,
És mindezért csupán hálát rebegnünk
Ahhoz, ki nyújtja mind e kéjeket. „
(*Madách Imre: Az ember tragédiája*)

Szakmai előrehaladásomat felsorolhatatlanul sok ember egyengette, a tanulás, tapasztalatszerzés útján 'hál Istennek' mindig akadt támaszom. Ez a munka a mikrobiológia tudományának hazai fejlesztését célul kitűző számtalan kolléga együttes, koordinált haladásának eredménye.

A mikrobiológia ösvényén Szabó István Mihály professzor úr indított el és vezetésével ennek a tudománynak a főútjára jutottam el. Nagyon hálás vagyok érte.

A kollégáimmal, doktorjelölt hallgatóimmal folytatott közös gondolkodás új utakra, gyorsabb haladásra ösztökölt. Külön is köszönet illeti ezért Kériné Borsodi Andrea, Kovács Gábor, Majorosné Tóth Erika, Nikolausz Marcell, Révész Sára, Romsics Csaba, Sipos Rita, Székely Anna szellemi és laboratóriumi partnerségét. Alig akadt olyan ötlet, kitűzött cél, amit ne értünk volna el.

A fáradhatatlan technikust Palik Pálné személyében ismerhettem meg. A sors nagy kegye, hogy az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén még többen is akadnak, akik nem nézik sem az órát, sem a napot az értelmes közös célok elérése érdekében. Balogh Lajosnéra, Simka Ágnesre, Gaga Zsuzsannára mindig számítani lehetett és lehet. Hihetetlenül sokat jelent ez számomra.

Hazai és külföldi kollégák megtisztelő bizalma, kishitúségeken átlendítő szavai, segítsége nélkül sokkal nehezebb lett volna az elmúlt két évtized.

Családom, elsősorban feleségem, mindent eltűrt, mindent elviselt, a rosszat nem rótt fel, együtt örült a sikereknek, levette a sikertelenségek, a fáradtság terhét.

Budapest, 2008. szeptember hó.

Márialigeti Károly

I. BEVEZETÉS

A mikrobiológia évszázados, alapvető vizsgálati módszere a tenyésztés. Fontosságát az operon modell atyja, Jacques Monod így fogalmazta meg: „The study of the growth of bacteria does not constitute a subject, or a branch of research, it is the basic method of microbiology” (Monod, 1949). Nyilvánvaló, hogy a mikroorganizmusok különböző összetételű tápközegeken való növekedésének tanulmányozása volt az alapja a biológiai sokféleség (biodiverzitás) megismerésének is. Mára a biodiverzitás feltárása a (környezeti) mikrobiológia, biotechnológia alapvető feladatává vált. Megállapításunkat alátámasztja az Egyesült Államok vezető mikrobiológus ökológusainak 1997-es figyelmeztetése: „If microbial exploration is not undertaken soon there will be a negative impact on both the scientific and industrial capabilities of the country (US)... Microbial diversity research is especially important because microbiological resources are commercially beneficial to those countries that can identify and develop them. ... Diversity [research] will impact all aspects of the society” (Staley és mtsai, 1997). Nem véletlen ennek fényében, hogy az elmúlt két évtizedben a biológiai sokféleség megismerésére irányuló eljárások körében valóságos módszertani forradalom zajlott le. Bár Monod "alapvető technikája", a tenyésztés ma sem nélkülözhető a mikrobiológiában (az érvényes fajleírás csak törzsekre alapozható ma is), nemtenyésztéses (zömében molekuláris) eljárások sokasága áll a környezeti mikrobiológusok rendelkezésére a bioszféra alapját képező mikroorganizmusok sokféleségének feltárására.

A biodiverzitás igen összetett fogalom, tartalomrendszere felöleli az anyagcsere folyamatoknak, az "életnek" (Bacteria, Archaea, Eukarya) és az ökológiai rendszereknek valamennyi formáját és magába foglalja az ezekben tapasztalható genetikai, fenetikai, faji és ökológiai szintű hierarchikus rendet (Márialigeti, 1996). A biológiai sokféleség tehát az élő rendszereket alkotó molekulák, a sejteket felépítő szerkezeti elemek, a sejtek (szövetek, szervek, szervrendszerek), az egyed, a faj, a populáció, a közösségek, az ökológiai rendszerek szintjén egyaránt értelmezhető, egészen a bioszféráig. Természetesen e szintek jó részében a sokféleség a genetikai sokféleséggel (polimorfizmus, variancia) szoros összefüggésben áll. A sokféleség megnyilvánulását a genetikai meghatározottság mellett a környezeti hatástényezők - legyen az élettelen, vagy élő környezet - jelentősen befolyásolják. A biodiverzitás mértéke az egyes típusok számával, azok (tér és időbeli) eloszlásával, aktivitásával fejezhető ki (polimorf gének, lókuszok száma, enzimaktivitások száma, egyedszám, fajszaám, diverzitási indexek stb.). A biodiverzitás fogalom középpontjában – a legtöbb kutató számára – a faj (taxon) diverzitás áll.

Az élővilág felosztását hagyományosan az aligha kielégítő számú és értékű bélyegekkel operáló „fenotípusos diverzitása” alapozva alkották. Feltűnő, hogy a mikroorganizmus csoportok fajsza ma megdöbbentően kicsiny más élőlénycsoportokhoz viszonyítva. Az ismert baktériumfajok száma mintegy 5.500, ~70.000 gomba, ~40.000 alga és ~30.000 protozoon fajt tartanak számon, míg az ismert rovarfajok száma ~700.000. Különösen kicsi a baktériumok fajsza ma. Itt figyelembe kell vennünk azt az - előbb már említett - tényt, hogy érvényes fajleírást csak a tenyészthető szervezetek törzseinek vizsgálatára alapozva tehetünk. Márpedig a „great plate anomaly” jelensége (a lemezeléssel kapott csíraszám értékeknél több nagyságrenddel nagyobb sejtszámot becsülhetünk mikroszkópos vizsgálatokkal) jól mutatja a baktériumok rejtett világát. A rohamléptekkel fejlődő molekuláris biológiai technikáknak a diverzitási vizsgálatokba történt bevezetése alapvető változást hozott a mikrobiológiában. A genetikai diverzitás vizsgálatára alapozva az élőlények és elsősorban a mikroorganizmusok valós filogenetikai rendszere már megalkotható. Természetesen a genetikai sokféleség, a genomok elemzését (genomika), gyorsan követte az ezek megnyilvánulását a fehérjék szintjén (proteomika) elemző munka. E kettő eredményeire támaszkodva fejlődik a lehetséges - akár közösségekben ellátott - feladatok vizsgálata (metabolomika, „fukcionomika”). Mindegyik terület elemzéseiben kulcsfontosságúvá vált - a molekuláris biológiai technikák alkalmazása mellett - a számítástechnika egy speciális ága, a bioinformatika.

Aligha kétséges, hogy az amerikai mikrobiológusok kormányuknak címzett figyelmeztetése megszívlelendő Magyarországon is. A mikrobiális aktivitások ugyanis a természet erőforrásainak ma még jórészt feltáratlan részét képezik. Kihasztnálásuk lehetősége, vagy az ellenük való védekezés szükségessége stb. nem ismer országhatárokat. Hazánkban ilyen figyelmeztetést és egyben a legátfogóbb tudományos összefoglalást jelentette (jelenti) Szabó István Mihály monumentális munkája „A bioszféra mikrobiológiája” (Szabó, 1988-1989). Az e könyvben megfogalmazott kutatási elvek alapján, a molekuláris eljárások relatíve tág skáláját adaptálva, részben továbbfejlesztve és korlátait bemutatva vállalkoztunk egyes környezetek baktérium diverzitásának korunk szintjén lehetséges nagy mélységű feltárására, és egyúttal a közösségi anyagcsere alapjainak megismerésére, a nyert ismeretek alkalmazására környezeti technológiák optimálásában.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. A mikrobiális diverzitás fogalma és forrásai

A biológiai sokféleséget a mikroorganizmusok körében három szinten értelmezzük – tárgyaljuk. Ezek:

- az intraspecifikus (genetikai) diverzitás,
- a faji (vagy élőlény szintű, esetleg taxon) diverzitás,
- az ökológiai (közösségi) diverzitás.

Vagy is a sokféleségnek - ebben az értelmezésében (Harper és Hackworth, 1995 nyomán) - határozott hierarchiája van, amely a nukleinsav bázissorrendtől a domének szintjéig, a nichetől a biomokig fogja át és bizonyos értelemben jellemzi a bioszférát.

Vegyük szemügyre először az intraspecifikus (genetikai) diverzitást. Átfogó mértékét napjainkban, a genomprojektek korában a teljes genom hasonlóság adatok alapján érzékeltethetjük és értékelhetjük. A baktériumok körében 30 % genom szintű "hibridizációs változatosság" engedhető meg a fajon belül (Wayne és mtsai, 1987; Stackebrandt és Ebers, 2006). Ha a genomhibridizáció százalékait a ma már rendelkezésre álló teljes genom elemzések adataira lefordítjuk, akkor az *Escherichia coli* példája talán a legmegfelelőbb. Az elsőként elemzett *E. coli* K 12 genomjának mérete 4,6 Mb, míg az utóbb elemzésbe vont *E. coli* O157 : H7 genomja 1,2 Mb-sal nagyobb. A gének szintjén számolva ez mintegy 800 "darabot" jelent. Az O157 : H7 törzs 1387 olyan gént tartalmazott, ami a K 12-ben nincsen meg, viszont 528 K 12 gént az O157 : H7-ben nem leltek meg (Perna és mtsai, 2001). Kiegészíthetjük ezt még azzal, hogy Pósfai és munkatársai (2006) célzott génkiütéses eljárás segítségével az *E. coli* K 12 genomját 4 Mb méretűre csökkentették és ma már 3,6 Mb körüli értéknél tartanak. Vagyis (figyelembe véve a 46 befejezett, vagy "futó" *E. coli* genomprojektet) az *E. coli* esetében a genom méretben is mintegy 30 % „diverzitás” lelhető. Hasonló értékeket találtak egyes *Bacillus*, *Lactobacillus* stb., sőt Archaea doménbe tartozó fajoknál is (Béja és mtsai, 2002). (Több, mint 1830 genomprojektet tartanak világszerte számon.)

Szembeállítva ezekkel az eredményekkel az ember esetében ismert adatokat (Staley, 2004 nyomán; 1. táblázat) feltűnő, hogy az emberi fajon belül ennél jóval nagyobb a genom szintű hibridizációs hasonlóság értéke (98,6 %). A genomméret arányában ennek pontos mértéke ma még nem is ismert, azonban csupán pár százalékra becsülik. Ezt a hihetetlen méretű különbséget az intraspecifikus diverzitásban több dologgal is magyarázhatjuk. Csak a két legfontosabbat emeljük ki. Az első a horizontális géntranszfer, ill. génvesztés lehetősége. Ennek mértékéről egy *E. coli* törzs tiszta tenyésztete esetében Vellai és mtsai (1999) munkája ad

képet. A tápanyagbőségben logaritmikus fázisban szaporodó törzs pulzáló terű elektroforézissel meghatározott kromoszóamérete mintegy 10 %-kal kisebb, mint a stacioner fázisba jutott tenyészeté. A szubsztrát bőségében nincs szükség sokféle „anyagcsere képességre”. Éhezésnél feltehetően az odáig csak egyes sejtekben pl. episzómális formában megbúvó információ beépül a kromoszómába, dinamikusán bővítve a „metabolikus potenciált”. Arra is következtethetünk ebből, hogy a "metabolikus potenciál" egy része a populáció szintjén lehet "elosztva". A második tényező már többé-kevésbé független a mikroorganizmusoktól, "elvi" tudományos kérdés: vajon az eukarióták vonatkozásában alkalmazott fajfogalom alkalmas-e, megfelelő-e a prokarióták körében és egyáltalán az intraspecifikus diverzitás jellemzésére alkalmasak-e az általunk előbbiekben használt genomjellemzők. Ezt a kérdéskört a következő fejezetben részletesebben fogjuk megvizsgálni.

Élőlény	Genom szintű hibridizációs hasonlóság	Genom-méret Mb	G + C mólarány %	16 / 18S rDNS variábilis bázisai	Változatosság a genom arányában
<i>E. coli</i>	> 70 %	5,8	48-52	> 15	~25 %
<i>H. sapiens</i>	98,6 %	3000	42	?	?
Főemlősök rendje	> 70 %		42	< 16	?

1. táblázat. Az *E. coli* és az ember genomszintű alapadatainak összehasonlítása Staley (2004) nyomán.

A faji szintű diverzitás határait talán az élőlénycsoportok ma ismert és becsült teljes fajszámainak bemutatásával jellemezhetjük. Bull és Stach (2004) ezzel kapcsolatos összefoglalását a 2. táblázatban mutatjuk be. A baktériumokra (vagyis a Bacteria és az Archaea domén leírt fajaira) vonatkozó legújabb adat (Bisby és mtsai, 2007) szerint 6590 érvényes fajnevet publikáltak, amelyből 1092 szinonima, vagyis a fajok száma 5498. Hihetetlenül csekély ez az érték a többi sejtes / szövetes szerveződésű élőlény fajszámához viszonyítva. Vajon tényleg ilyen csekély a baktériumfajok száma, vagy más okokat kell e kis szám mögött keresnünk. Az előbbiekben már említett fajfogalommal kapcsolatos okok természetesen itt is igazak, de ki kell ezt egészítenünk még azzal is, hogy a baktérium fajleírás szabályai szerint a faj csak törzsek jellemzésére alapozva nevezhető meg. A baktériumok (és más mikroorganizmusok) nagy része pedig tapasztalatunk szerint nem tenyésztethető. E jelenséget régóta ismerik a mikrobiológusok. A "közvetlen" mikroszkópos sejtszámlálás és a lemezeléssel történő (telepképző egységekre [TKE] alapozott) csíraszám meghatározás közötti drámai különbséget Staley és Konopka (1985) „grate plate anomaly” néven jelölte meg. A 3. táblázatban különböző élőhelyek esetében mutatjuk be a hagyományos eljárásokkal tenyésztésbe vonható "csírák szá-

mát" a tapasztalt sejtszámok arányában. A fajszámok vonatkozásában e számok persze nem mértékadóak, hiszen egy-egy tömeges elterjedésű faj egyedei okozhatják a különbséget. Mégis a baktériumfajok számának 10^3 nagyságrendje alighanem 2-3, akár 4 nagyságrenddel is nagyobb kell legyen. Mielőtt e feltételezésünket megindokoljuk, megjegyezzük, hogy a baktériumok nagyon sok különböző okból nem vonhatók tenyésztésbe, feltéven, hogy életképesek (viable but nonculturable; Xu és mtsai, 1982). Csupán néhány környezeti mikrobiológiai ok: nem megfelelő a táptalaj, életciklusuk nyugalmi szakaszát nem tudják megszakítani, csak szintróf partnerrel együtt szaporodnak.

Élőlénycsoport	Ma leírt	Fajszám (ezerben)		
		Különböző várható teljes		Mértékadó érték a várható teljes fajszámra
		fajszám becslések értéktartománya*		
Növények	270	300	- 500	320
Gerincesek	45	50	- 55	50
Ízeltlábúak	1 065	2 375	- 101 200	8 900
Puhatestűek	70	100	- 200	200
Fonalférgek	25	100	- 1 000	400
Protozoonok	40	60	- 200	200
Algák	40	150	- 1 000	400
Gombák	75	200	- 9 900	1 500
Baktériumok	5	50	- 3 000	1 000
Vírusok	4	50	- 1 000	400
Egyéb csoportok	115	200	- 800	250
Összesen	1 754	3 635	- 118 855	13 620

*A mai fajfogalmak alapján.

2. táblázat. A nagy élőlénycsoportok fajszámai Bull és Stach (2004) nyomán.

Élőhely	Tenyésztésbe vonható baktériumok aránya %	
Tengervíz	0,001	- 0,0001
Édesvizek	0,1	- 0,25
Mezotróf tóvíz	0,1	- 1
Folyótorkolati (brakk) vizek	0,1	- 3
Eleveniszap	1	- 15
Vízi üledékek, víz alatti talajok	0,1	- 0,25
Szárazföldi talajok	0,25	- 0,3

3. táblázat. A tenyészthető baktériumok aránya a kimutatott mikroszkópos sejtszámok viszonyában egyes élőhelyeken (Amann és mtsai, 1995).

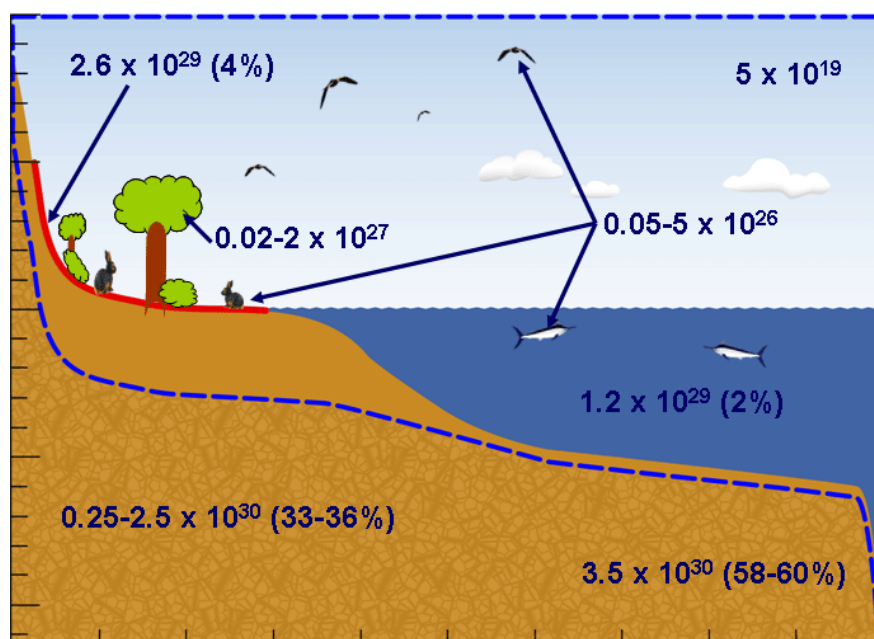
Megközelíthetjük a baktériumok lehetséges fajszámának kérdését egyszerűen a méretek felől. Ha elfogadjuk azt a rovarok körében igazolt feltételezést, hogy egy-egy élőlénycsoport mérete és fajszáma fordítottan arányos, vagyis minél kisebb a méret, annál nagyobb a faj-

szám, megint csak azt mondhatjuk, hogy a baktériumok jelenlegi fajszáma töredéke lehet a valósnak. A nagyon sok különböző fajszám becslés közül csupán még egyet említünk meg, amely a szimbiotikus kapcsolatok vizsgálatára alapoz. Az elmúlt évek elemzéseire engednek következtetni, hogy szinte minden ízeltlábú fajból legalább egy új baktérium szimbionta leírható. Hasonlóképpen igaz ez a tengeri gerinctelenek felületén élő (epibionta) baktériumok esetében, vagy metanogén Archaea és gazdaszervezeteik (ciliáták) esetére (Hackstein, 1997; Polz és mtsai, 2000; Breznak, 2004). Semmiképpen sem túlzó tehát legalább egymillió baktériumfaj meglétéről beszélni a ma elfogadott (a következő fejezetben ismertetésre kerülő) fajdefiníció alapján.

Whitman és munkatársainak (1998) becslése szerint a bioszférában $4 - 6 \times 10^{30}$ prokarióta sejt él mintegy 2000 különböző élőhelyen (1. ábra). E sejtek 350 - 550 Pg C-t ($1 \text{ Pg} = 10^{15} \text{ g}$), 85 - 130 Pg N-t, 9 - 14 Pg P-t foglalnak magukba. Vagyis a prokarióták sejttömegének széntartalma 80 - 100 %-a a növényekben foglalt széntartalomnak, míg a nitrogént és foszfort illetően a növényekre becsült globális érték tízszeresét tartalmazzák. Ráadásul a szaporodási rátájuk is a legnagyobb, évente 1.7×10^{30} sejt keletkezik / újul meg. Ez a döbbenetes "baktérium populáció" méret és a gyors növekedés hihetetlen diverzitás forrása.

A becsült 2000 élőhelyből a fontosabbak, a legnagyobb biomasszával jellemezhető „élőhelytípusok”: vízi élőhelyek (óceánok, tavak és folyók a fenékküledék felső 10 cm-es rétegével együtt; $\sim 1.2 \times 10^{29}$ sejt), talajok (egyéb felszíni formációk 8 m mélységig; $\sim 2.6 \times 10^{29}$ sejt), felszín alatti közegek (szárazföldön 8 m-nél mélyebben $\sim 0.25 - 2.5 \times 10^{30}$ sejt; óceánokban a 10 cm-es felszíni üledékréteg alatt $\sim 3.8 \times 10^{30}$ sejt), állatok (bélcsatornája, felülete, egyéb szervei; $\sim 0.05 - 5 \times 10^{26}$ sejt) növények (föld feletti részeinek mikróbaközösségei, a gyökérmikrobiótát a talajmikrobióta részeként számítva; $\sim 0.02 - 2 \times 10^{27}$ sejt), levegő ($\sim 5 \times 10^{19}$ sejt). Ezeken az élőhelyeken a mikroorganizmusok megbecsülhetetlen számú közösségbe szerveződnek. Amennyiben az ökológiai (közösségi) diverzitást akarjuk tehát felmérni a mikroorganizmusok körében gyakorlatilag lehetetlent próbálunk tenni. Gondoljunk csak bele, hogy a „makroorganizmusok” esetében a tér-idő skálán hogyan változik a fajdiverzitás. Vajon hogyan értelmezhető a térskála a baktériumok esetében? Aligha tehetjük föl a kérdést úgy, hogy mekkora a fajdiverzitás a biomok, kontinensek szintjén, vagy akár a táji megközelítés is értelmetlennek tűnik. Egyes szerzők (pl. Tørsvik és mtsai, 2002) 100 cm^3 -nyi talajt vonnak párhuzamba a biomokkal. Ami az idő skálát illeti, ott már egyszerűbb a dolog, „csupán” arra kell figyelni, hogy optimális környezeti körülmények között a baktériumsejtek megkettőződési ideje akár 1 óránál is rövidebb lehet. De vajon mondhatunk-e pl. a töl-

gyesek jellemző előfordulási helyeinek analógiájára valami ilyet: „can an *Arthrobacter* landscape be predicted?” (Tiedje, 1995).



1. ábra. A baktériumok megoszlása Földünk főbb élőhely típusai között. Mintegy $4 - 6 \times 10^{30}$ prokarióta sejt legalább 2000 különböző közösségben él. A legfontosabb élőhelytípusok becsült globális baktérium sejtszámát Whitman és mtsai (1998) nyomán tüntettük fel.

A mikrobiológusok zöme egyetért abban, hogy minél inkább szelektív egy környezet, annál egyszerűbb - legalább a szűkebb anyagcsere típusok, magasabb taxonok megnevezése szintjén - becslésekbe bocsátkozni. De vajon igaz-e az az állítás, hogy a mikróbák legnagyobb része a Földön általános előfordulású (ubikviter) szervezet. (Ubikviter, vagyis mindenütt megtalálható, még ha nem is mindenütt alkot jelentős populációt; Findlay és Clarke, 1999). Jó néhány publikáció eredményei utalnak erre. Így pl. a Balatonból izolált *Synechococcus* törzsek (Duleba és mtsai, 2008) genetikai diverzitása nem haladja meg a faji mértéket domináns tengeri törzsek, hőforrások biofilmjéből kimutatott, vagy hazai szikesekben jellegzetes *Synechococcus*-októl (Felföldi és mtsai, 2008). De hasonló tapasztalt Barreto (2004) a szilíciumpikkelyes algák esetében: pocsolyák a Pilis-hegységben, a Balaton, más hazai tavak, sőt Dánia parti vizei egyaránt tartalmazzák a *Synura petersenii* fajt. Talán ellenálló cisztája révén terjedhetett így el. Vagyis mind pro-, mind pedig eukarióta mikroorganizmusok esetében fel kell tételeznünk hatékony szóródási (terjedési) mechanizmusokat. Ráadásul a mikroorganizmusok földi elterjedése az Élet több mint 3,5 milliárd éves kora alatt végig zajlott szemben az utóbb evolválódott „makroorganizmusokéval” (nem kívánunk itt foglalkozni egy-egy faj „életidejével”). A terjesztők közé a szél és a szél hajtotta víz, valamint az állatok (pl. költöző

madarak) mellé mára alighanem felsorakozott az ember is. A világkereskedelemben szállított termékekkel együtt mikroorganizmusok fajainak tömege utazik (Carlton és Geller, 1993).

Mindezek ellenére vannak endemizmusok is, és feltétlenül beszélhetünk egyfajta mikrobiális biogeográfiáról. Közismert például a humán patogén mikroorganizmusok regionális elterjedése (a vakcináció előtti időszakban is) a Földön. Pl. a *Chlamydia trachomatis* faj mindenütt jelen van a Földön, szerotípusai mégis regionális elterjedést mutatnak (trachoma - zömmel Észak-Afrika, lymphogranuloma venereum - egyenlítői országok, sterilizációhoz vezető húgy-ivarszervi gyulladások - elsősorban Európa, Észak-Amerika; Corder és mtsai, 2006). Nyilvánvaló, hogy ennek háttérében az emberi populációk különbségei is állnak. Általánosságban is elmondhatjuk, hogy a más élőlényekkel többé-kevésbé szoros szimbiózisban élő mikroorganizmusok gazdájukkal együtt fordulnak csak elő. A szabadon élő mikroorganizmusok között is találunk azonban nagy valószínűséggel olyanokat, amelyek Földünknek csupán néhány pontján fordulnak elő, mert pl. szélsőséges környezeti feltételekhez adaptáltak (Bourain és mtsai, 2002).

II.2. Rendszertani alapok. A fajfogalom a mikrobiológiában

A különböző élőlénycsoportokkal foglalkozó szakértők talán csak két rendszertani alapérték elfogadásában értenek egyet. Ezek:

- a faj a természetben létező alapegysége az élőlényeknek,
- a rendszerezésnek filogenetikai alapelvekre kell épülnie.

Nagyon is jogos az előző megállapításban a „talán” szócska használata, hiszen pont a mikrobiológusok körében sokan elfogadják Vandamme és munkatársai (1996) nézetét: „There will never be a definitive classification of bacteria”. Nem kevesen pedig ma is osztják Haldane (1949) véleményét, aki szerint egy faj „is a fiction, a mental construct without objective existence”.

A rendszertan tudománya azonban ennél sokkal egyszerűbbnek tűnő dolgokban sem egységes. Így mindjárt a magyar *rendszertan* szónak az angolban (latinban) két megfelelője van, a taxonómia és szisztematika kifejezés. Cowan (1978) rendszertani szótára szerint a két kifejezés szinonim, legfeljebb annyiban térnek el, hogy a taxonómia mintegy a gyakorlati munkát jelenti (vagyis a törzsek faji szintű azonosítását; „a klinikai mikrobiológus pl. taxonómus”), míg a szisztematika a rendszertani elvek kialakítását, a terület elméleti alapjainak kidolgozását összegzi. Hasonló véleményt alkotnak Varga és mtsai (1997) is, bár a taxonómia és szisztematika fogalmát mindenképpen különállónak tekintik (4. táblázat). Más szerzők esetében éppen fordítva látjuk ezt a meghatározást, szerintük a taxonómia az élőlények

csoportosításának elméleti és gyakorlati tudománya, míg a szisztematika ennél sokkal tágabb értelmű, amelyben evolúciós és filogenetikai összefüggésekbe helyezik a rendszerezést (Stackebrandt, 2006). A mikrobiológiában közmegegyezés látszik körvonalazódni abban, hogy a rendszertan (taxonómia) három alapvető területe az osztályozás tana (klasszifikáció), a nevezéktan (nomenklatura) és az azonosítás (identifikáció) művelete. Negyedikként a szisztematika területéről mindenképpen mellé kell tennünk az új rendszertani alapegység, a fajleírás műveletét (determináció).

Taxonómia	Szisztematika
Biológiai sokféleség (diverzitás)	
jelenségek	összefüggések
tapasztalati (empirikus)	elméleti (hipotetikus)
elemző (analitikus)	felépítő (szintetikus)
részekre bontó (particionáló)	egységbe foglaló (integráló)
tényfeltáró (konkretizáló)	általánosító (absztraháló)
leíró (deskriptív)	eredeztető (genealogikus)
névadó	szabályalkotó
összehasonlító	értelmező
azonosító (identifikáló)	meghatározó (determináló)
elrendező	rendszerező
idiografikus	nomotétikus

4. táblázat. A taxonómia és a szisztematika jellemzői (Dévai, 2000) nyomán.

Az osztályozás művelete az emberre jellemző megfigyelési, ennek alapján „mintázat” keresési, rendszerezési "hajlam" eredménye (Hey, 2001). Két nagy csoportba sorolhatjuk az osztályozási alapelvek szerint ezt a műveletet. Az ún. „természetes rendszer” az élőlények filogenetikai rokonságát veszi alapul. A többi rendszerben valamilyen ettől független gyakorlati cél vezérli a rendszerezést, pl. az élőlények veszélyességi csoportokba sorolása (risk group) ilyen. (Később látni fogjuk, hogy a klinikai mikrobiológus „faj igénye” is ilyen.) Míg a filogenetikai rendszer megalkotása a növények és állatok körében már nagyon korán relatíve egyszerűnek látszott a fossziliák tanúságaira alapozva, valamint Ernst Haeckel 1866-ban tett megállapítása alapján (az egyedfejlődés [ontogenezis] megismétli a törzsfejlődést [filogenezis]; Molnár, 2005), a mikroorganizmusok körében ez már közel sem volt ilyen egyszerű.

A természetes osztályozás alapegysége a „makroorganizmusok” világában a természetes, vagy biológiai fajfogalomra alapozott faj lett, amelynek kijelölése - egyszerűen fogalmazva - a szexualitáson alapul. Szerzők sokasága határozta meg a biológiai fajfogalmat rövidebben, vagy pontosabban, netán egy-egy élőlénycsoportra fókuszálva. Itt csupán két megfogalmazást idézünk. Wilson (1992) szerint „a species forms a population whose members are

able to interbreed freely under natural conditions". Bővebben Mayr (1976) megfogalmazásában: "Two communities have to be regarded as two species if they do not exchange genes. The inhibition of gene flow can result from geographical / spatial / temporal isolation of two communities that share a common ancestry. Other genetically controlled means to achieve isolation can be: behavioural, anatomical, physiological".

Sajnos egyik előző fajfogalom sem alkalmas arra, hogy a mikroorganizmusok körében alkalmazzuk. A prokarióták vonatkozásában ez a „klasszikus szexualitás” hiánya miatt (a prokarióták haploidok) evidencia, bár...! Ha csupán a géncseréről volna szó... Történtek próbálkozások a horizontális géntranszfer fajkeletkezésre gyakorolt hatásának megbecslésére (Lan és Reeves, 2000), azonban a kérdés nyugvópontra nem jutott. Az eukarióta mikroorganizmusok körében már változatosabb a kép. Bár esetükben „definíció szerint” jellemző a szexuális szaporodás valamely formája, sok csoportban nem ismerjük azt (pl. Török és mtsai, 2008). Egyebekben pedig zömében a morfológiai bélyegek képezik a fajdefiníció alapját, méghozzá csoportról-csoportra más és más elvek szerint (pl. kovamoszatok, csillósok). A legutóbbi években, esetükben is egyre kiterjedtebben alkalmazzák a molekuláris bélyegeket, de nem találunk egységes szabályozást a faji határokat illetően. Katz (2002) egyébként kétségbe vonja, hogy a biológiai fajfogalom előbbieken említett megfogalmazásai, vagy egyáltalában a biológiai fajfogalom alkalmas-e az eukarióta mikroorganizmusok fajainak megjelölésére. A mikroeukarióták egy jó részének genomja ugyanis kiméra, vertikális és laterális (horizontális) génáramlási események változatos során keresztül evolválódott. A következőkben csak a prokarióta fajfogalomra koncentrálnak.

II.2.1. A bakteriológiai fajdefiníciók

A prokarióták tenyészetekben tapasztalható viszonylagos alaki szegénysége már a bakteriológia tudományának hajnalán lehetetlenné tette a morfológiai fajdefiníció megalkotását (a gazdag alaktani bélyegeket mutató sugárgombákat [aktino- és / vagy streptomiceták, ma Actinobacteria] akkoriban a gombák között rendszereztek). A fajmegjelölésben hamar uralkodóvá vált a biokémiai, élettani bélyegek jellegzetes együtteseinek alkalmazása, amelyek hatékonyan egészítették ki a néhány máig megtartott morfológiai karaktert (sejtalk és méret, csillózat típusa, endospóra alak és méret, osztódási típus stb.). Ez a „monotétikus” csoportosítás természetesen feltételezte, hogy az alkalmazott bélyegek nem variábilisak (Goodfellow és mtsai, 1997). Ennek következtében azonban párhuzamos rendszerek alakultak ki szinonim fajok tömegével. Egyes ipari tekintetben fontos csoportok esetében (pl. az antibiotikum termelő sugárgombák) „túlcsoportosítás”, más orvosi, vagy környezeti tekintetben jelentős fajok

esetében pedig nagyon tág taxonok jöttek létre (pl. a Gram-pozitív termofil aerób légző spóraképző pálcák zöme a *Bacillus stearothermophilus* "gyűjtőfajba" tartozott).

Mivel a prokarióták körében a természetes fajfogalom megalkotása lehetetlen feladatnak látszott, az egyes (párhuzamosan működő) rendszerek más és más fajdefinícióra (meghatározásra) épültek. A klasszikus klinikai gyakorlatban általában szelektív és differenciál táptalajokon kitenyésztett egyedi törzsek meghatározását végzik. A határozókulcsok mind a mai napig a fajok néhány (akár 1-2) „nem variábilis” fenetikai bélyegének eltéréseire épültek / nek. A faji határokat inkább az dönti el, hogy az okozott betegség szimptomái azonosak és a gyógyítás egyazon protokoll szerint történik. A fajok rokonsági viszonyai, esetleges filogenetikai helyzete számukra lényegtelen (volt). E fajdefiníció tarthatatlanságát a járványtan egyre fokozódó igényei ugyanakkor jól jelezték / jelzik. Egy járvány során ugyanis mikroevoúciós folyamatok nyomon követésére van szükség, így kifejezetten lényegesek - faj alatti szinten is - a "rokonsági viszonyok".

A környezeti bakteriológusok zöme nagy törzs kollekciókkal dolgozik. Számukra a fajok „rokonsági viszonyai” lényegesek, mert ez alapján is megpróbálnak az egyes mikróbafajok környezeti szerepére következtetni. De ugyan emiatt azután biokémiai, élettani, ökológiai tesztek sokaságát végezték / végzik el. A faji szintű fenetikai csoportokat a nagyon nagy számú vizsgált bélyeg miatt - amint a számítógépek megjelentek - a számítógépes csoportelemzés segítségével állapították meg.

A számítógépes (numerikus) taxonómia (taxometria) és a taxospéciesz fajdefiníció megalkotója Sneath (1972) az egyes törzseket „számításba vont taxonómiai egységnek” (OTU, operational taxonomic unit) nevezi. Az egymástól független tulajdonságokat egyenlő értékűnek tekinti. A legalább 60 (de akár több száz) tulajdonság alapján minden egyes OTU minden másikkal való hasonlóságát számszerűen fejezik ki pl. (leggyakrabban) az egyszerű hasonlósági koefficiens (simple matching, Sokal and Michener coefficient) kiszámításával (Skerman, 1967): $S_{SM} = a$ megegyező (akár pozitív, akár negatív eredményű) bélyegek száma / az összes vizsgálatba vont bélyegek száma. Gyakran alkalmazzák a Jacquard hasonlóságot, amely kizárja a számlálóban a negatív hasonlóságok beszámítását.

Az így nyert hasonlósági értékek alapján (leggyakrabban) pl. a súlyozatlan csoportátlag, az UPGMA (unweighed pair group method of averages), vagy egyszerű lánc (single linkage) eljárással csoportelemzést végeznek, aminek az eredménye egy dendrogram (fenogram). Egy fajba tartozó törzseket egyesítenek azok a hasonlósági csoportok (fenonok), amelyek S_{SM} átlaghasonlósága 70 - 80 % feletti. A vizsgálatokba törzsgyűjteményekből beszerzett autentikus (típus) törzseket is bevonnak. Annak a fenonnak, amelybe autentikus törzs

csoportosul automatikus az identifikációja (Sneath, 2001). A csoportelemzés magyarországi bevezetője, úttörő alkalmazója Szabó István Mihály (1974) volt.

Ezt a fenetikus fajdefiníciót 1984-ben a Bergey's Manual of Systematic Bacteriology hasábjain Staley és Krieg így fogalmazta meg: „a bacterial species may be regarded as a collection of strains that share many features in common and differ considerably from other strains. (...). One strain of a species is designated as the type strain; this strain serves as the name bearer of the species and is the permanent example of the species, i.e. the reference specimen for the name.” Vagyis a bakteriológiában a természetes fajfogalom hiánya – lehetetlensége miatt kialakult egyfajta megegyezéssel (konszenzus) fajdefiníció, amely a baktériumtörzsek (számszerűsített) fenetikai hasonlóságán alapul.

A rendszeralkotás gyötrelei mellett hatalmas munkát végeztek a nomenklatúra területén is. 1948-ban jelent meg az önálló - a botanikai kódtól független - International code of nomenclature of bacteria - ICNB (Lapage és mtsai, 1992). A szabályok birtokában a fajdefiníció változásával és a hasonlóság alapú fajmeghatározási elv megerősödésével párhuzamosan lényeges változások történtek a nomenklatúrában. Az International Committee on the Systematics of Bacteria (ICSB) által létrehozott alkalmi munkabizottság kidolgozta az „Approved list of bacterial names” címen közzétett anyagát. (Az első vázlat 1976-ban jelent meg [First draft], majd a végleges lista: Skerman és mtsai, 1980). Ez a munka meghatározta az 1980. január 1-én érvényes baktériumneveket, és egyben mintegy „védette” tette ezeket (nem változtathatók meg). Az addig 30-40 ezresre tehető fajnév lista 1800 körüli értékre csökkent. Ezzel párhuzamosan pedig szabályozták az érvényes baktérium faj leírás feltételeit. Megállapították, hogy a fajok leírása csak törzsek alapján lehetséges. A törzsek közül meg kell jelölni a típustörzset és azt, mint referenciapéldányt nyilvános nemzeti és nemzetközi törzsgyűjtemény(ek)ben el kell helyezni (deposition). A fajleíró közlemény rendszertani értelemben hiteles, érvényes (valid publication) csak azzal a feltétellel lesz, ha „a szabályos faj (nemzetség, család, ...) név és a teljes, szabályszerű faj (nemzetség, család, ...) leírás” megjelenik az International Journal of Systematic Bacteriology (ma: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) hasábjain eredeti közlemény formájában, vagy a folyóiratszámok elején közzétett „érvényesítő közleményben” (validation list). Ez utóbbi a más folyóiratok hasábjain megjelent, de szabályszerű fajleírásokat, fajneveket sorolja fel, érvényesíti (a publikáció forrásának megjelölésével).

A számítógépes taxonómia bélyegei közé természetesen bevonták az újabb és újabb módszertani fejlesztések nyomán meghatározott további fenetikus bélyegeket is. Talán a leglényegesebb a baktériumsejteket alkotó egyes vegyületek minőségi és mennyiségi elemzésére

alapozott kemotaxonómia eredményeinek adaptálása volt. Elsőként az egyes sejtfalalkotók kémiai felépítése (pl. peptidoglikán keresztkötő oligopeptidek jellegzetességei, a lipopoliszacharid felépítése: elsősorban a szerológiai tulajdonságok egy részéért felelős ismétlődő egység stb.), majd utóbb a membránalkotó foszfolipid zsírsavak, légzési kinonok, a sejtfal lipidek, az Archaea membrán izoprén glicerinéter lipidjei stb. (a teljesség igénye nélkül) (pl. Schleifer és Kandler, 1972; Shaw, 1975; Minnikin és Goodfellow, 1980; Collins és Jones, 1981; Erola és Lehtonen, 1988; Goldfine és Langworthy, 1988).

A kemotaxonómiai bélyegek között megjelentek a nukleinsavak jellemzésére használt adatok, elsősorban a kromoszóma alkotó bázisok guanin + citozin aránya (GC content of the DNA base; Mandel, 1969), illetve a hibridizációs hasonlóságvizsgálat (rRNS / DNS; pl. De Smedt és De Ley, 1977; DNS / DNS, pl. De Ley, 1970). Ez utóbbi munkákat már egyre többen végezték Zuckerkandl és Pauling (1965) elméleti cikkének fényében, akik azt a véleményüket fejtették ki, hogy az élőlényeket alkotó molekulák egy része (elsősorban a DNS), ill. a molekulák szerkezetváltozásai jelentőséggel bírnak a törzsfajlódást illetően. Az olyan „szemantida” (szemantofor – jelentés hordozó) molekulák, mint pl. a citokróom c, vagy az azt kódoló gén DNS-e. Az egész kromoszóma, de különösen annak egyes génjei egyféle molekuláris óráként (molecular chronometer) mutatják a szervezet evolúciós állapotát, helyzetét, sőt útját az élet kialakulásától.

E kutatások eredményeként jelent meg a bakteriológiában a genetikai fajdefiníció (Wayne és mtsai, 1987), amely kimondja: két törzs egy fajba tartozik, amennyiben teljes genom hibridizációs hasonlóságuk 70 %-nál nagyobb (a hibrid DNS és a törzsek DNS-e közötti olvadáspont különbség, $\Delta T_m > 5^\circ\text{C}$). Az ilyen módon kimutatott genotípust csak akkor szabad azonban faji szintre "emelni" és lehet érvényesen leírni, ha a törzseket fenotipikai különbségek is jellemzik. Vagyis ez a fajmeghatározás a genetikai kutatások eredményeinek bevonása mellett érvényesíti a Colwell (1970) által bevezetett polifázikus taxonómiai elvet. Ez utóbbi közlemény megjelenése idején arra figyelmeztetett, hogy a rendszertan „többsíkú” (multidimensional), az információ különböző szintjeit (pl. morfológia, biokémia, kemotaxonómia) alkalmazza. Ma jórészt arra figyelmeztet, hogy a fajnak a különböző fajmeghatározások alapján konszenzussal jelöljük ki a helyét.

A Carl Woese által kidolgozott 16S rRNS katalogizálás, majd később a stopnukleotida eljárásra alapozott 16S rDNS bázissorrend elemzés és a 16S rRNS bázissorrendjének elsődleges szemantidaként való felhasználása - vagyis Carl Woese munkásságának (feltehetően) legfőbb eredményei - megalapozták a bakteriális filogenezis létrejöttét (Sogin és mtsai, 1971; Woese és mtsai, 1974; Woese és mtsai, 1975; Woese és Fox, 1977; Lane és mtsai, 1985;

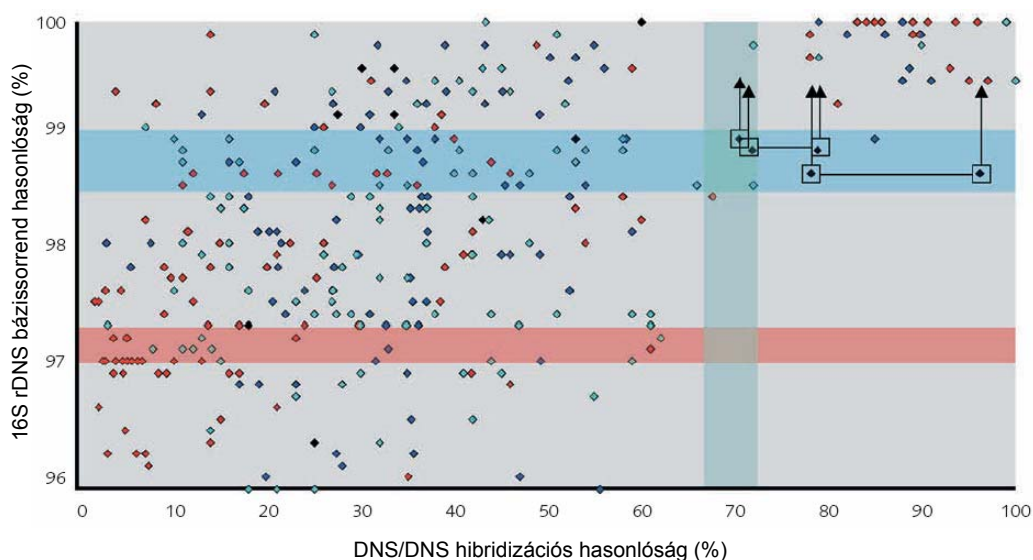
Woese, 2000). Erko Stackebrandt, a bakteriális rendszertan egyik legkiemelkedőbb szakértője - visszatekintve - az eredményeket így összegzi: „phylogeny is based on homology” (Stackebrandt, 2006). Megjegyzése erősen utal a bakteriológiai fajdefiníciókban szereplő hasonlóság (similarity) szóra. Itt azonban a fenotípusos adatokat és az egyszerű (nem súlyozó) csoportelemzést felváltja a genotípusos adatokat elemző kladisztikus kiértékelés.

A bakteriális fajdefiníció szintjén is megjelentek az előbbieken - címszavakban - ismertetett eredmények. A baktériumtörzsek faji hovatartozása molekuláris kronométerekekre alapozva határozható meg, természetesen a polifázikus elv szem előtt tartásával. A számok nyelvére lefordítva két törzs egy fajba tartozik, amennyiben a teljes genom hibridizációs hasonlóság $> 70\%$ és a 16S rDNS (fenetikai) hasonlósága $> 97\%$ (Stackebrandt és Göbel, 1994). Majd pedig visszaülve Staley és Krieg 1984-es definíciójára 2002-ben a következő definíciót adják (Stackebrandt és mtsai, 2002): egy baktériumfaj „is a category that circumscribes a (preferably) genomically coherent group of individual isolates / strains sharing a high degree of similarity in (many) independent features, comparatively tested under highly standardised conditions”.

A DNS / DNS hibridizációt illetően Stackebrandt és Göbel már 1994-ben felhívták a figyelmet, hogy csak a közel rokon fajok megkülönböztetése esetében van értelme használni (módszertani nehézségek miatt). E véleményt 2006-ban még tovább finomították (Stackebrandt és Ebers, 2006). Ellenőrizték az International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55. (2005) kötetében megjelent fajleírások 16S rDNS és DNS / DNS homológia adatait és a korreláció alapján (2. ábra) annak a vélekedésüknek adnak hangot, hogy 99% alatti 16S rDNS homológia esetén felesleges a DNS / DNS hibridizáció elvégzése, mert az bizonyosan 70% -nál kevesebb lesz. Megjegyezzük, hogy a teljes genom bázissorrend elemzések szerint egy-egy fajban a 16S rDNS operonok között a maximális diverzitás értéke $1,26\%$ (pl. Perna és mtsai, 2001).

A „molekuláris korszak” eredményei természetesen még további fajdefiníciókat is „hoztak”. A leglényegesebbek talán, a filospéciesz (Rosselló-Mora és Amann, 2001), az ökospecés (Cohan, 2002), vagy a genomospéciesz (Lan és Reeves, 2000). A filogenetikai fajfogalom szerint: a species is „a monophyletic and genomically coherent cluster of individual organisms that show a high degree of overall similarity with respect to many independent characteristics, and is diagnosable by a discriminative phenotypic property”. Tulajdonképpen ezt a fajdefiníciót „kanonizálja” Stackebrandt és mtsai 2002-es munkája. A genomospéciesz fogalom a háztartási, vagy „mag” gének (core set of genes) 1% -os hasonlóságértékében jelöli meg a faji határokat. A „mag” gének a baktériumtörzsek 95% -ában jelen

vannak, valójában a sejtés élet alapját teremtik meg. Az ökoszpeciesz fogalma inkább a fajkeletkezés szempontjából érdekes. Cohan (2002) szerint a helyi (mikrohabitat) feltételekhez történő adaptáció a faj képződés hajtóereje. Az élőhelyhez történő adaptációval pedig a baktériumpopulációban a genetikai diverzitás periodikusan nullázódik minden egyes mikrohabitatban az ahhoz adaptált ökoszpeciesznél.



2. ábra. A 16S rDNS gén bázissorrend hasonlóságának és a DNS / DNS teljes genom hibridizációs hasonlóság értékeknek az összefüggése az International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology hasábjain 2005-ben megjelent fajleírásokban. A pontok színei a genomszintű hibridizációs hasonlóság mérési módszereit jelzik (piros - mikrotiter lemez technika [pl. Ezaki és mtsai, 1989], sötétkék - spektrofotometriás eljárás [De Ley és mtsai, 1970], világoskék - membránszűrős módszer [pl. Tourova és Antonov, 1987], fekete - egyéb [pl. ponthibridizáció, Amakata és mtsai, 2005], vagy nem közölt eljárás). A vonalak egy-egy faj különböző eljárással meghatározott hasonlósági értékeit kötik össze, a nyilak pedig azt mutatják, hogy az in-silico (utólag) elvégzett 16S rDNS hasonlóság számítás alapján a publikált adatnak hol kellene elhelyezkednie (vagyis ebben az esetben hibát követtek el a kérdéses fajleírások szerzői [és lektoraik is]).

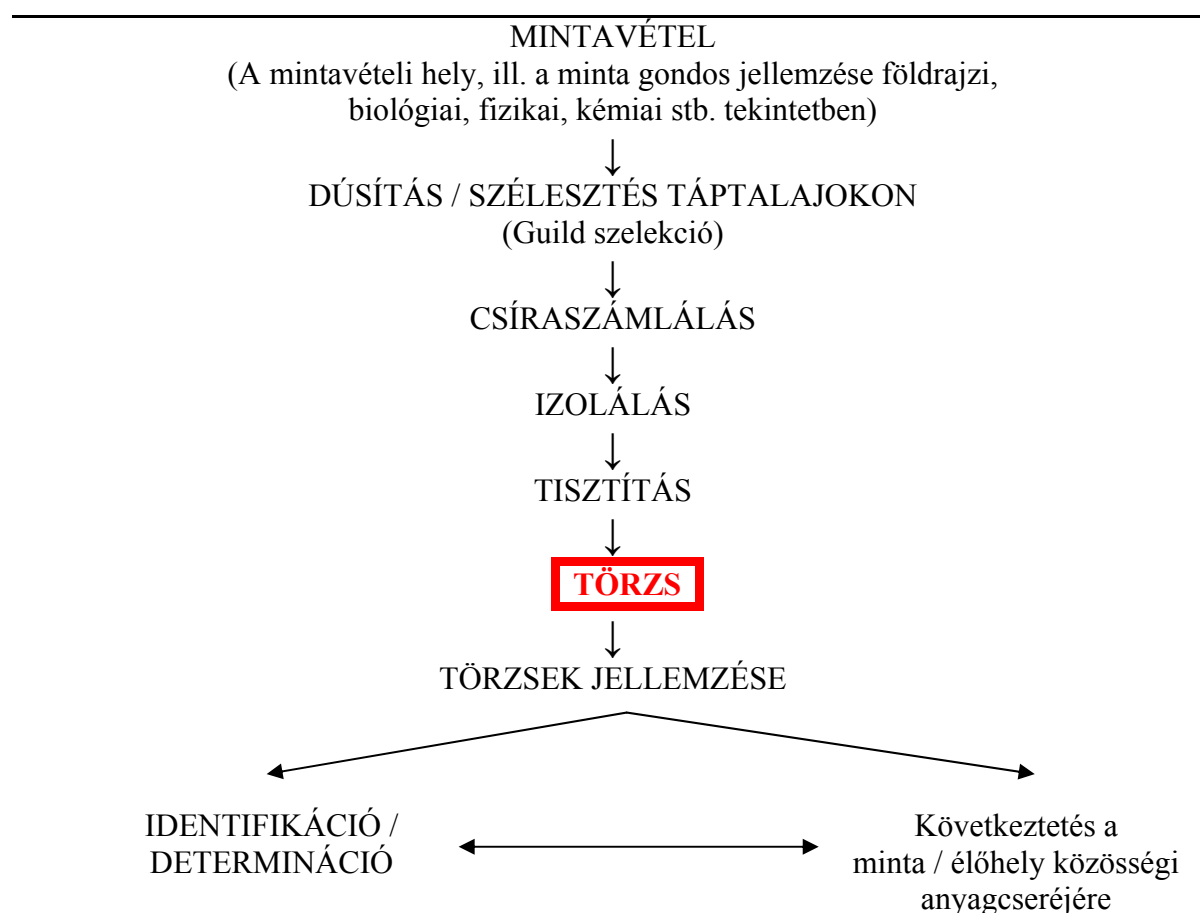
A bakteriológiai fajdefiníció tehát továbbra is a hasonlóságra alapul, bár egy hihetetlenül fontos változással: a „similarity” (taxoszpeciesz) mellett / helyett megjelent a homology (filoszpeciesz) fogalma. A kialakult módszerek azonban immár lehetővé teszik tenyésztés nélkül is a fajok (legalábbis a genoszpecieszek, egyes szerzők szerint a genomok) nyomon követését. Alighogy Carl Woese publikálta első eredményeit a 16S rRNS alapú filogenetikáról, megjelentek Norman Pace és munkatársainak erre alapozott nemtenyésztéses diverzitás vizsgálatai (pl. Stahl és mtsai, 1985; Olsen és mtsai, 1986). A következő fejezetekben ezekről adunk összefoglalót.

II.3. Környezeti bakteriológiai vizsgáló módszerek áttekintése

A hagyományos környezeti mikrobiológiai vizsgálati eljárások műveleti sorrendjét a 3. ábrán mutatjuk be. A mintavétellel kapcsolatban csupán azt a megjegyzést tesszük, hogy a mintának mind a vizsgált terület, mind pedig a vizsgálat célja (oka) szempontjából reprezentatívnak kell lennie. A jó mintavétel az alapja a megbízható, értelmes eredményeknek. Az egész eljárás kulcsa a tenyésztés, amely nyilvánvalóan szelektív eljárás. Egy-egy táptalajon egy-egy a táptalaj összetételének megfelelő anyagcseréjű baktériumtenyészet kifejlődésére számíthatunk. A tenyésztésbe vont baktériumok legnagyobb része aerób, kemoorgano-heterotróf, eukarbofil szervezet, vagy a litotrófok közül a környezeti, biotechnológiai szempontból fontos csoportok tagja (pl. nitrifikálók, metanogének). A tenyésztés végső eredményeként a hagyományos környezeti mikrobiológiai vizsgáló eljárások középpontjában álló törzseket nyerjük. A törzs egy olyan (lehetőleg) tiszta tenyészet, amely három lényeges kritériumnak meg kell feleljen (Szabó, 1988): *a.*) ismert eredetű, *b.*) számjelzéssel (egyedi azonosítóval) ellátott, *c.*) folyamatos át és továbboltással fenntartott. Vagyis élő állapotban tartjuk fenn és vetjük alá számtalan vizsgálatnak, amelyeknek eredménye és körülményei a törzsszám alapján mindig visszakereshetők és a törzs származási helyére is vonatkoztathatók. Nagyon lényeges tulajdonsága a törzseknek, hogy közöttük megtalálhatók a fajok típustörzsei és gyűjteményekben elhelyezhetők (és elhelyezendők), vagyis referenciaként rendelkezésünkre állnak.

A törzsek jellemzése a legkülönbözőbb módszerekkel történhet / történik. A módszerek kiválasztásának szempontja kettős. Az egyik feltétlen a rendszertani, hiszen a faji hovatartozás megállapítása „megnyitja” a szakirodalmi összehasonlítás lehetőségét. A másik pedig a vizsgálat célja által körülhatárolt módszerekre irányul (pl. egy biológiai korrózió gyanújánál célszerű a savtermelést, H_2 hasznosítás képességét, H_2S termelést stb. elemezni). A rendszertani törzs karakterizálás jellemző sorrendjét hagyományosan a Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, illetőleg a Prokaryotes kézikönyv legújabb kiadásainak ajánlása szerint állapítjuk meg (Garrity, 2001; Dworkin és mtsai, 2006). Mindenesetre tartalmaz telep és mikroszkópos morfológiát, biokémiai, élettani, ökológiai bélyegeket, kemotaxonómiai jegyeket, vagyis a fenotipikai jellemzés teljes fegyvertára felvonultatható az adatértékelésre szolgáló statisztikai eljárások (csoportelemzés) használatával együtt. A fenetikai adatok, valamint az identifikáció segítségével elérhető szakirodalmi hivatkozások alapján lehetővé válik a környezet, a minta leírása. Az eredmények összevetése a mintaterület, a minta egyéb (fizikai, kémiai stb.) adataival segíti a működés, a közösségi anyagcsere megismerését. Megjegyezzük, hogy a

minta mikroszkópos vizsgálata a sejtszámok meghatározása, a minta heterogenitásának feltárása stb. révén sok szinten segíti a működés megismerését.



3. ábra. A hagyományos környezeti mikrobiológiai eljárások műveleti sorrendje.

Ma, amikor a baktériumok, ill. valamennyi mikroorganizmus filogenetikai rendszere kialakult és e tekintetben a mikrobiológia egy horizontot észlel a növény és állatvilág leszármazásának kutatóival (Woese, 2006) a rendszertani elemzés „alfájává” a 16S rRNS (vagy az azt kódoló DNS) bázissorrend meghatározása vált. Ez az adat a riboszómális RNS szekvenciák tízezreivel hasonlítható össze a Ribosomal Database Project nyilvános adattömege használatával (Maidak és mtsai, 2001), és rendezhető a kiválasztott homológokkal együtt jó felbontású, statisztikailag megbízható törzsfákba megfelelő algoritmusokkal (Felsenstein, 1988; Ludwig és Klenk, 2001). Így a filogenetikai hasonlóság alapján először kijelölik a faji pozíciót, és csak ezután ellenőrzik a fenotípusos kulcsbélyegeket.

A tenyésztésre alapozott környezeti mikrobiológiai vizsgálatoknak több nehézsége is van. Az első mindjárt a korábban már említett „great plate anomaly” (Staley és Konopka, 1985), és következményei, vagyis a baktériumoknak csak egy töredéke tenyészthető. Jól jel-

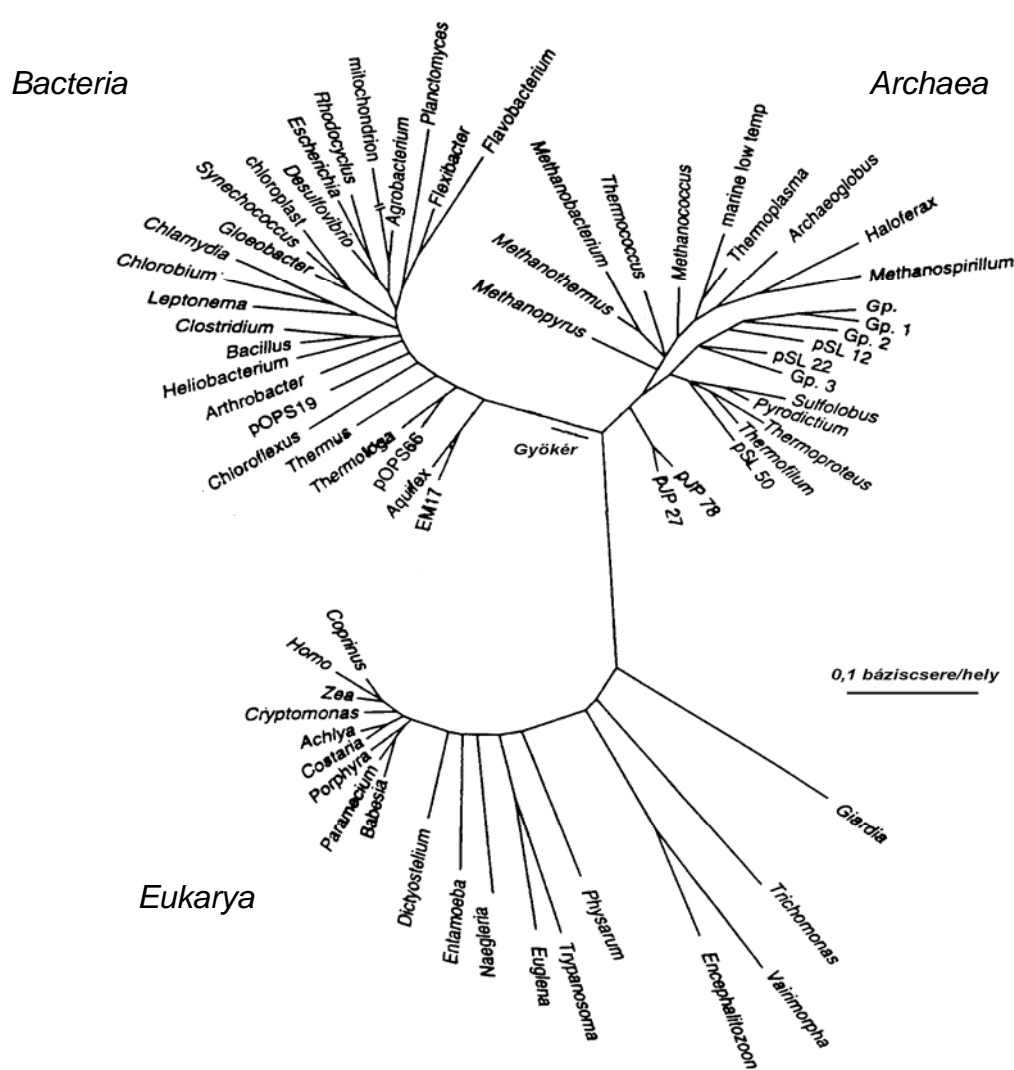
lemzi ezt a helyzetet a 4. ábrán bemutatott univerzális filogenetikai fa (Pace, 1997). Tudatosan választottam azt a 10 évvel ezelőtt közzétett törzsfát, amelyiken a Bacteria körében már megjelenik törzs (phylum, a bakteriológiában divízió) szintű nem tenyésztett taxon (a pOPS19 jelzéssel képviselt). Az Archaea körében pedig ország (regnum) szintű fő leszármazási vonalat reprezentál a pJP 78 és pJP 27-es szekvencia. Az 5. ábrán egy 2002-ben közzétett univerzális törzsfát láthatunk (Moreira és López-Garcia, 2002), amelyben már mindhárom doménben számos nem tenyésztett nagyobb taxon kapott helyet. Ennek a Bacteria doménra vonatkozó részét a 6. ábrában mutatjuk be (Ludwig és Klenk, 2001 nyomán Stackebrandt, 2004). A tenyészthető fajok zöme 6 törzsbe tartozik. 10-100 tenyészthető fajt találunk 12 törzsben, csupán egynéhány tenyészthető fajt ismerünk 6 törzsből és 20 törzsben pedig egyetlen tenyészthető faj sincsen.

A tenyésztési eljárás következő lényeges hiányossága, hogy nem nyerünk arról információt, vajon a tenyésztésbe vont mikrobák a vizsgált közegben aktív anyagcserét folytattak-e, vagy esetleg kitaró képletek formájában, nyugalmi állapotban voltak ott jelen. Nincs közvetlen információnk a konkrét biokémiai aktivitásaikról sem. A fenotípusos jellemzés alapján csupán következtetünk arra, hogy milyen feladatokat láthatnak el egyáltalán a közösségi anyagcserében. Nem mértékadó az egyes baktériumok sejtszámára vonatkozó eredmény sem, különösen pedig nem nyerhetünk információt a tenyésztési eljárás segítségével a mikroorganizmusok térbeli viszonyaira, esetleges sejt-sejt kapcsolataikra vonatkozóan. Összegezve, tulajdonképpen nem tudunk, vagy kellő mélységben nem tudunk válaszolni a klasszikus ökológiai kérdésekre.

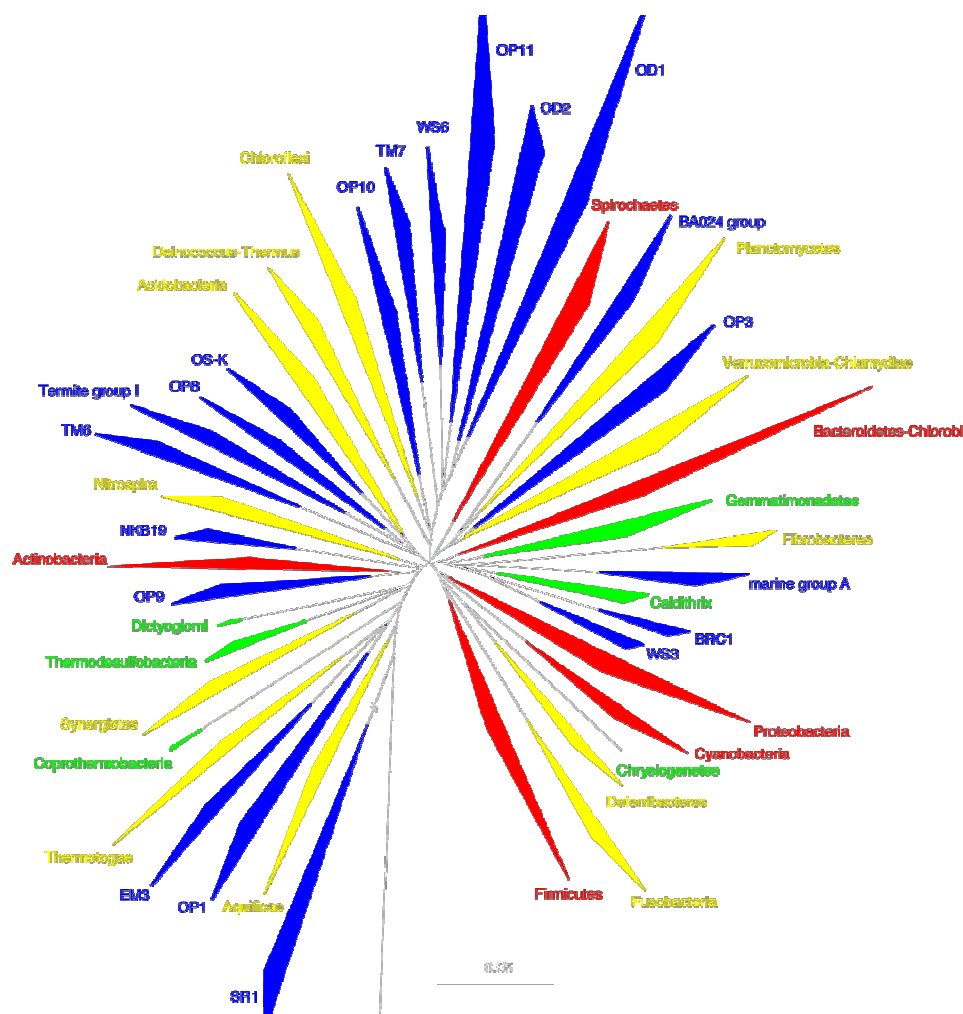
E kérdések pontosabb, nagyságrendekkel mélyebb értékű megválaszolására hívhatjuk segítségül a nemtenyésztési eljárásokat. A nemtenyésztési környezeti mikrobiológiai eljárások műveleti sorrendjének áttekintését a 7. ábrán mutatjuk be. A sejtek kémiai alkotóelemeinek két típusát célozzák a vizsgálatok. Egyik esetben a nukleinsavakat vonjuk ki, amelyek közül a DNS-re alapozott további eljárások az egyes fajok, ill. filospécieszek jelenlétét, ill. számát (mennyiségét) mutathatják meg (vagy legalábbis egymáshoz viszonyított arányukat). A riboszómális RNS minőségi / mennyiségi elemzése már a sejtek aktivitására utal, hiszen az aktív fehérjeszintézis feltételezi, hogy ebből a molekulából is sok lesz egy sejtben. Az mRNS-ek egy része kettős jelentést hordozhat. Egyes gének ugyanis amellet, hogy enzimaktivitást (környezeti funkciót) kódolnak, meglehetősen konzervatívak és a baktériumok (mikroorganizmusok) kisebb-nagyobb csoportjának filogenetikai helyzetét is jelzik. Vagyis faj és környezeti enzimaktivitás együttesen detektálható. A vizsgálatok alapját képező nukleinsav szaporítás művelete persze befolyásolja a mennyiségi következtetések levonásának lehetőségét.

Míg a filotípusok faji szintű azonosításához vagy a vegyes környezeti nukleinsavból nyert egyes PCR termék molekuláris klónozására van szükség (és a klónok azonosítására), vagy pedig a molekuláris ujjenyomat eljárások segítségével az egyes filotípusok mintáinkban való jelenlétét, vagy hiányát detektálhatjuk és sokszor egymáshoz viszonyított mennyiségi arányukat is. Párhuzamosan végzett DNS, ill. RNS alapú ujjenyomat vizsgálatok jelenlét-aktivitás mintázatokat adnak kezünkbe.

Szemben a teljes nukleinsav kivonáson és elemzésen alapuló módszerekkel a sejtek lipid alkatrészeinek kivonása esetén a mennyiségi becslést nem zavarja egy „jelsokszorozó” lépés (a specifikus nukleinsav szakaszok elszaporítása pl. PCR segítségével). Cserében persze az eljárás érzékenysége és felbontó képessége is sokkal csekélyebb. A mintákban nagy tömegben jelenlevő sejtek lipidjeit fogjuk csak érzékelni (domináns fajok) és itt hasonlóan a DNS, ill. az RNS "jelentéséhez" a membrán zsírsavak inkább a jelenlétre utalnak, a kinonok



4. ábra. Az élővilág univerzális törzsfája a riboszóma kis alegységi RNS bázissorrendjére alapozva (Pace, 1997). A méretvonal 0.1 változást jelez nukleotidonként.



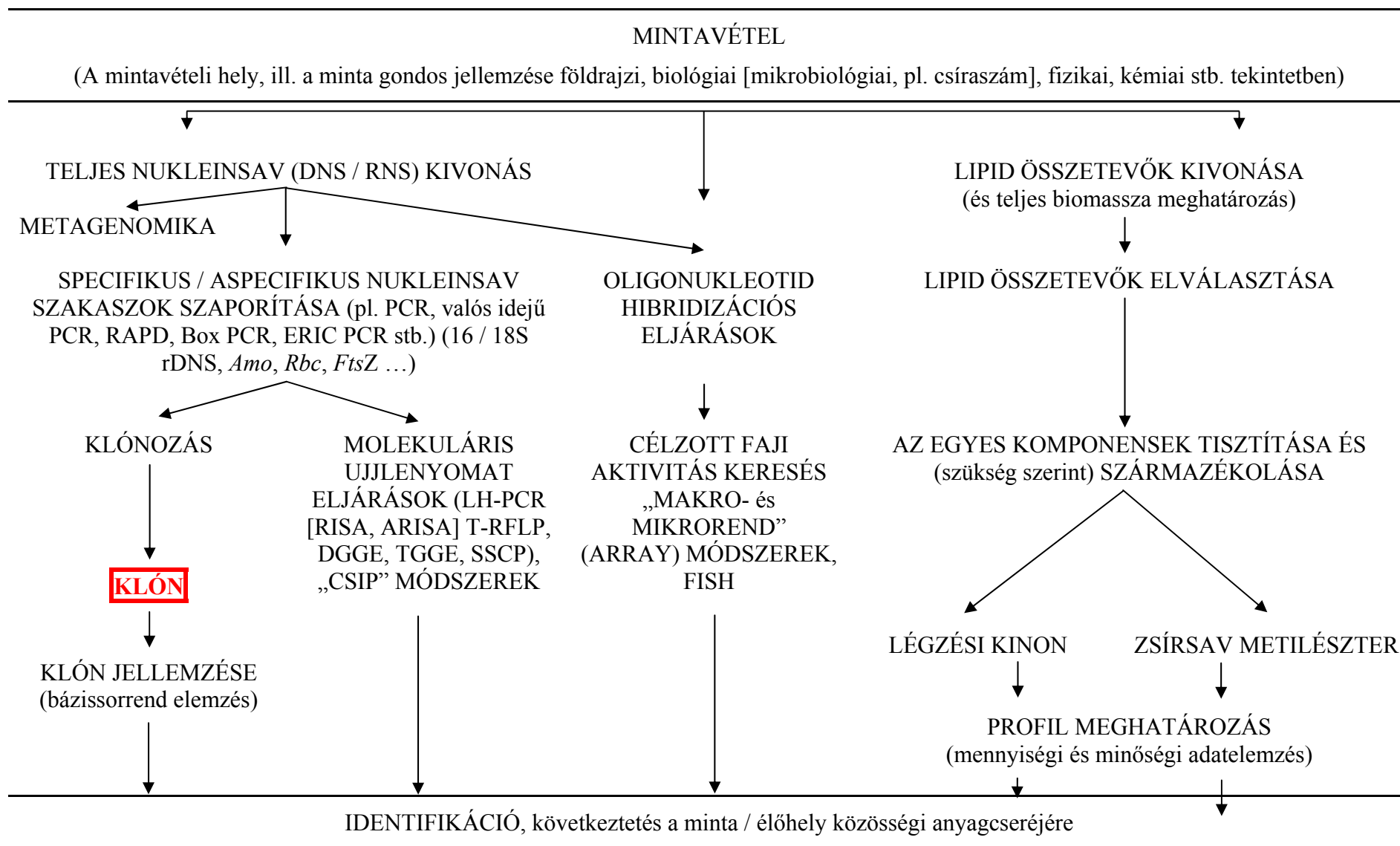
6. ábra. A Bacteria domén filogenetikai törzsfája a riboszóma kis alegységi RNS bázissorrendjére alapozva (Stackebrandt, 2004). A méretvonal 0,05 megváltozást jelent nukleotidonként (ARB parszimónia számítással). Hat törzsbe tartozik a tenyészthető fajok zöme (piros), 12 törzsben 10 - 100 faj tenyészthető (sárga), 6 törzsben 1 - 10 faj tenyésztett (zöld), legalább 20 törzsben egyetlen tenyészthető fajt sem mutattak még ki.

abban feltüntetett eljárások messze nem tükrözik valamennyi környezeti mikrobiológiai molekuláris technikát. Mindjárt elsőként említjük meg a tenyésztési és molekuláris eljárások egy fajta összekapcsolását, a stabil izotópos eljárást (stable isotope probing, SIP), vagy a radioaktív izotópos technikát (radioactive isotope probing, RIP) (Lee és mtsai, 1999; Boschker és mtsai, 1998; Nikolausz és mtsai, 2007).

II.3.1. A nukleinsav kivonáson alapuló környezeti bakteriológiai eljárások

II.3.1.1. Nukleinsav kivonás

A természeti közegekből történő nukleinsav kinyerésnek két elvi lehetősége létezik. Az egyik lehetőség, hogy a közegben lizáljuk a baktériumsejteket, majd pedig ezt követően



7. ábra. A nemtenyésztéses környezeti mikrobiológiai eljárások műveleti sorrendjének áttekintése.

választjuk el belőle a nukleinsavakat. A másik esetben először kinyerjük a baktériumsejteket, majd ezek után azokból extraháljuk a nukleinsavakat. Ez utóbbi eljárás vizek esetében evidensnek tűnik és látszólag könnyen megvalósítható (membrán) szűrés segítségével. Természetesen ekkor a szűrő anyaga lesz az a közeg (no meg a vízben levő és a szűrőn fennakadt többi szuszpendált szerves és szervetlen anyag), amelyből a nukleinsavakat ki kell vonni. Végeredményben itt is egy afféle „szilárd” közeget nyerünk. Talajok esetében egyébként a legelső "teljes" DNS kivonást szuszpendálás és frakcionált izopiknikus centrifugálás segítségével történő sejt-kinyerést követően végezték (Torsvik, 1980). A talaj mátrixban történő sejt-lízist majd az ezt követő DNS kinyerést Ogram és mtsai (1987) dolgozták ki. Ma már DNS kivonó kitek tömege kapható készen ez utóbbi eljárásra, mégis gyakran fordul elő, hogy bizonyos mintákból 4-5 különböző módszer alkalmazásával sem kapunk DNS-t. A laboratóriumban legutóbb kőolajszármazékokkal szennyezett homoktalajokból nem tudtunk a lízist követően DNS-t extrahálni. A megoldást végül Torsvik (1980) eljárásának módosításával találtuk meg. A különböző környezeti DNS kivonó módszereket pl. van Elsas és mtsai (2000) összefoglalásukban részletesen áttekintik.

Az előző fejezetben a hagyományos tenyésztési eljárás egyik hibájaként róttam (ró-ják) fel annak szelektivitását. A nukleinsav kivonáson alapuló környezeti mikrobiológiai vizsgáló módszerek leginkább szelektív, kritikus lépése pont a nukleinsav kinyerés. Mindenki számára nyilvánvaló, hogy egy sokkomponensű talajmátrix esetében lehetetlen valamennyi mikróbasejt kinyerése. (Megjegyezzük, hogy ez a hiba a szélesztési tenyésztési eljárást is terheli, hiszen pl. a talajszuszpenzió készítése során ugyanígy szelektíven fognak a nagyobb talajrészecskékről leválni a mikrobák.) A másik eljárás esetében pedig a konstans negatív töltésű nukleinsavak akár irreverzibilisen kötődhetnek a szubsztrát valamely alkotó részéhez (pl. agyagásványok). Nem tökéletes a különböző mikróbasejtek feltárása sem. Míg sok mikróbasejt egyszerű KOH-os kezelésre feltáru (ilyen egyszerű eljárást ismertet Romsics és Márialigeti [2008]), más sejtek, pl. endospórák, gombasejtek még erőteljes mechanikus behatásra sem nyílnak fel (Frostegård és mtsai, 1999; Martin-Laurent és mtsai, 2001). A túlzott mechanikus kezelés pedig, ha fel is nyitja a sejteket, gyakorta annyira roncsolja a DNS-t is, hogy további vizsgálatokra alkalmatlan lesz. Megjegyezzük, hogy a sikeres DNS kivonás nem feltétlen jelenti a további lépések sikerét, mert a nyert nukleinsav többszöri tisztítás ellenére is tartalmazhat pl. enzimgátló anyagokat.

Az előző bekezdésben utaltam rá, hogy természeti közegekből gyakorta még ma sem „rutin” a DNS kivonás. Az RNS kivonása (legyen az rRNS, vagy mRNS) talán egyetlen esetben sem „rutin”. A Nikolausz és mtsai (2004) kéziratában közzétett eljárásunk kidolgozása és

rutinszerű alkalmazása több mint egy évet vett igénybe. Az RNS kivonás közismert nehézségét az RN-áz enzimek általános előfordulása és nagy környezeti stabilitása okozza. Esetünkben a mechanikai (sejtmalom) sejtfeltárással párhuzamosan Trizol reagenssel inaktiváltuk a sejtekből kiszabaduló nukleázokat. Megjegyezzük, hogy a precíz nemtenyésztéses diverzitásvizsgálatokhoz RNS mentes DNS-re, ill. viszont, DNS mentes RNS-re van szükség.

Összegezve nukleinsav kivonásról írtakat, meg kell állapítanunk, hogy nincsen egyfajta általánosan alkalmazható módszer. Eljárásunkat a közeg ismeretében kell megválasztani és kísérletekre alapozva illeszteni - optimalni a vizsgálati cél függvényében.

II.3.1.2. Nukleinsav szaporítás, PCR

Amennyiben pusztán a mikróbaközösség diverzitásának számszerű becslése (diverzitási indexek számolása) a célunk a nemtenyésztéses eljárásban, akkor erre bevált néhány nem specifikus mintázatképző DNS szaporítási eljárás. Ilyen a random amplifikációs PCR eljárás (RAPD, random amplification of polymorphic DNA; AP-PCR, arbitrarily primed PCR; Welsh és McClelland, 1991), vagy a Box-PCR (Martin és mtsai, 1992), az ERIC PCR (Versalovic és mtsai, 1994) (összefoglalóan REP-PCR) A legelső esetben rövid (8 - 12 bázisnyi) kezdőszekvenciákat (primer) véletlenszerűen generálnak és az ezekkel a primerekkel végzett PCR eredményeképp változatos hosszúságú termékeket kapnak. A Box- és az ERIC PCR esetében pedig (a prokarióták körében kevésbé jellemző) konzervált ismétlődő (repetitív) elemekre tervezett primer párral végeznek DNS sokszorozást. Itt is változatos hosszúságú ampikonokból álló terméket nyerünk. A PCR termék elektroforézise nyomán kapott csíkok számából következtetni lehet a baktérium közösség diverzitására.

A nemtenyésztéses baktérium diverzitás vizsgáló eljárások során a filospécieszek kimutatását különböző molekuláris kronométer gének elemzésével végzik. Bár több próbálkozás is történt a kinyert környezeti DNS, ill. a környezeti RNS-ből másolt cDNS (az RNS-ek csekély "féléletideje" miatt általánosan azok DNS kópiájával dolgoznak) közvetlen klónozására (először Ward és mtsai, 1990) a módszer nehézkessége (a klónok közül szelektálni kell a kronométer gént tartalmazókat) és elég erőteljes szelektivitása (pl. a klónozható DNS mérete) miatt nem vált általánossá. Azt a stratégiát követik általánosan, hogy először a kronométer géneket szaporítják el a vegyes környezeti DNS-ből, majd a nukleinsav szaporítás termékét klónozzák (vagy használják az ujjlenyomat eljárásokban) (Giovannoni, 1991). A bakteriológia területén a nukleinsav szaporítás szinte kizárólagos eljárásaként a polimeráz láncreakció (PCR) terjedt el, annak ellenére, hogy megjelenése idejében több – akár izotermális – eljárás is ismert volt (5. táblázat). (Kétségtelen, hogy a PCR a "legproduktí-

vabb" eljárás.) A PCR reakciókban Pace és mtsai (1986) nyomán elsősorban a 16S rDNS-t szaporítjuk a rendelkezésre álló különböző „univerzális”, vagy „taxon specifikus” primerek segítségével. A 16S rRNS filogenetikai információ "tartalmát" a 6. táblázatban mutatjuk be (Ludwig és Klenk, 2001).

Eljárás	Az amplifikált nukleinsav	Enzim(ek)	Hőmérséklet	Cél specifikus oligonukleotidok száma	Amplifi- káció szintje
PCR	Célszakasz	termostabilis DNS polimeráz	50 - 98 °C, hőmérsékleti ciklus	2	10 ¹²
QβR	Próba	Qβ replikáz (4 alegységes)	37 °C, izotermális	1	10 ⁹
LCR	Próba	termostabilis DNS ligáz	50 - 98 °C, hőmérsékleti ciklus	4	10 ⁵
3SR (ma NASBA)	Célszakasz	Reverz transzkriptáz, RN-áz H, RNS polimeráz DNS	42 °C, izotermális	2	10 ¹⁰
SDA	Célszakasz	polimeráz, restrikciós endonukleáz	37 °C, izotermális	4	10 ⁷

5. táblázat. A PCR és az elterjedése idején alkalmazott további nukleinsav szaporító eljárások áttekintése.

A polimeráz láncreakció működése, kinetikája egyetlen templát esetére kiválóan ismert. Keveset tudunk azonban arról, hogy a környezeti mikrobiológiában általános kevert templát, vagyis homológ, de nem azonos célszekvenciák keverése esetében mi is történik. Több kutatás számol be ún. preferenciális amplifikációról (Hansen és mtsai, 1998; Polz és Cavanaugh, 1998; Becker és mtsai, 2000), ami pedig a nemtenyésztéses eljárás alkalmazhatóságát mind mennyiségi, mind pedig minőségi tekintetben befolyásolja. A PCR során szaporított DNS csak akkor reprezentálja a fajok (filospécieszek) abundancia viszonyait, ha az amplifikációs hatékonyság azonos valamennyi templát molekulánál. Ehhez azonban néhány feltételnek mindenképpen teljesülnie kell:

- minden molekula azonos módon legyen hozzáférhető a primer számára,
- a pimer-templát hibrid azonos hatékonysággal képződjék minden esetben,

- a DNS polimeráz extenziós hatékonysága legyen azonos az összes templáton,
- a ciklusszám növekedésével a szubsztrát fogyás azonos módon befolyásolja az összes templát típust.

Bázissorrend helyek	Bacteria				Archaea			
	Konzervált		Variábilis		Konzervált		Variábilis	
	hely	%	hely	%	hely	%	hely	%
	568	36,8	974	63,2	571	37	971	63
Variábilis helyek meg- oszlása a lehetséges bázisváltások szerint	2	3	4		2	3	4	
	23,2 %	13,5 %	26,5 %		28,3 %	15,4 %	19,3 %	

6. táblázat. A 16S rDNS filogenetikai információtartalma. Az adatok az *E. coli* 1542 bázisból álló 16S rRNS molekulájának bázishelyeire vonatkoznak. Az RDP II. adatbázis alapján történt a számítás (Ludwig és Klenk, 2001).

Valamennyi feltétel aligha áll fenn egy átlagos közösségi vizsgálatnál. Suzuki és munkatársa az első pont feltevéseit cáfolták (Suzuki és Giovannoni, 1996), mivel az általuk felállított vizsgálati rendszerben a PCR termék, a kezdeti templát aránytól függetlenül, az 1 : 1 arányhoz tartott. A szerzők szerint a ciklusokkal növekvő kópiaszám egy adott koncentráció felett a reannelláció (vagyis termékek egymáshoz kötődése) révén gátolja a templát - primer hibrid keletkezését, ami a domináns templát kópiaszám-növekedésének lassulásával jár. Habár környezeti minták vizsgálatánál is bizonyították a jelenséget (Suzuki és mtsai, 1998), utalnak arra, hogy diverz minta esetén kicsi az esélye, hogy bármely amplikon elérje a gátló koncentrációt. A második pont alapfeltevése is nehezen tartható, hiszen a biodiverzitás vizsgálatokban gyakran használt univerzális, domén specifikus primerek általában tartalmazznak degenerált régiót (a szakzsargonban "lötyögést"). Nagyon gyakran a tervezésnél bizonyos számú nem szabályos bázispárosodás (*mismatch*, lötyögés) eleve elfogadott. Arról, hogy a denaturálódott DNS szerkezete, illetve a tisztítási lépések ellenére jelenlévő DNS-hez kötött fehérje, humuszanyag stb. molekulák milyen módon befolyásolják a primer extenziót, csak sejteink lehetnek.

A módszerben rejlő problémák mellett a különböző baktérium fajok eltérő genomszerkezete a hibák egy újabb forrását jelentheti (Farely és mtsai, 1995). A prokarióták (Archaea és Bacteria domén) genommérete, a 16S rRNS gén kópiaszáma, a riboszómális operonok szerkezete nagy mértékben befolyásolja a PCR alapú megközelítés végeredményét. A genomméret 600-tól 13 000 Kb-ig változhat, sőt még a kromoszóma szám is változó. A *Brucella melitensis* pl. egy 2 100 és egy 1 150 Kb méretű kromoszómát tartalmaz. A

16S rRNS-t kódoló gén kópiaszáma 1 és 14 közötti, és az operonok helyzete a kromoszómán is nagyon változatos. Ilyen tekintetben mintáinkban beszélhetünk a mikróbaközösség sejt-szamarányáról, a DNS és akár a vizsgált gén kópiaszám arányáról is.

RNS minta esetén a PCR-t megelőzi a reverz transzkripció, amelynek során cDNS szintetizálódik. Az RNS alapú vizsgálatok hibáját azonban szakirodalmi hivatkozások hiánya miatt nem tudjuk becsülni, bár feltételezhető, hogy a különböző baktériumokból származó rRNS eltérő térszerkezete mindenképpen eltérő hatékonyságot eredményez a reverz transzkripció során. Azt is csak feltételezhetjük, hogy a különböző hőfokon, eltérő reverz transzkriptázokkal végrehajtott cDNS szintézis valószínűleg befolyásolja a közösségi vizsgálat eredményét. A nagy hőmérsékleten denaturálódó RNS könnyebben hozzáférhető a polimeráz számára, míg kisebb hőmérsékleten az RNS molekulák eltérő konformációi nagymértékben befolyásolják az átírási hatékonyságát. A reverz transzkripció nehézségét jelenti még az átíráshoz szükséges primerek választása. Az a tapasztalatunk, hogy specifikus primerekkel csak aránylag rövidebb szakaszokat sikerül amplifikáltatni, szemben az ún. random hexamerekkel (Nikolausz és mtsai, 2004). A reverz transzkripció során esetlegesen fellépő arányváltozásokat - ismereteink szerint - eddig még nem is vizsgálták.

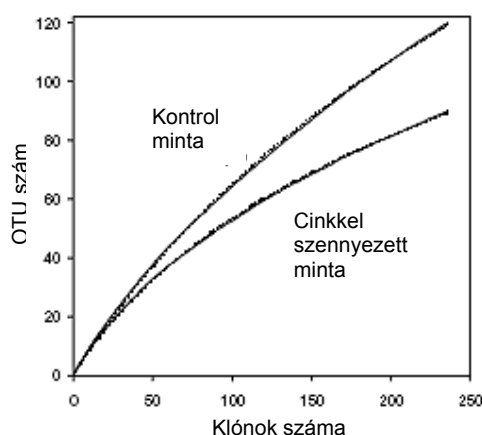
II.3.1.3. Klónozás

A környezeti vegyes nukleinsav templátból a PCR eredményeképpen kb. azonos hosszúságú, azonban sok különböző filospécieszhez tartozó amplikon keletkezik. A 16S rRNS-t kódoló gén hossza szűk határok között ugyan, de nagy variabilitást mutat a baktériumok körében. Az ismert legrövidebb rDNS mintegy 1,35 Kb, míg a leghosszabb több mint 1,54 Kb. Ahhoz, hogy bázissorrend elemzést végezhessünk „egyfajú” templátra van szükség. A megoldást a vegyes PCR termék molekuláris klónozása jelenti. A molekuláris ökológiai vizsgálatokban az ún. tompa végű és TA klónozási stratégiák alkalmazhatók (a „ragadós vég” módszer nem alkalmas, még ha a TA stratégia valójában egyfajta enzim katalizálta atipikus ragadós végű klónozást jelent is). Ennek során a PCR terméket legalább két szelekciós markerrel jelölt, és több restrikciós endonukleáz enzim vonatkozásában pontosan ismert emésztési helyeket tartalmazó plazmidba építjük be. Ezt követően pedig kompetens *E. coli* sejteket transzformálunk a plazmidokkal. A transzformált *E. coli* sejteket megfelelő táptalajon szélesztjük és a kinőtt, 16S rDNS inzertet tartalmazó plazmidokat hordozó telepeket izoláljuk. Ez utóbbi műveletet teszi lehetővé a többszörös szelekció:

- a táptalajba tett megfelelő (leggyakrabban ampicillin) antibiotikum csak a transzformánsok növekedését-szaporodását engedi, ha a plazmid antibiotikum rezisztencia gént hordoz;

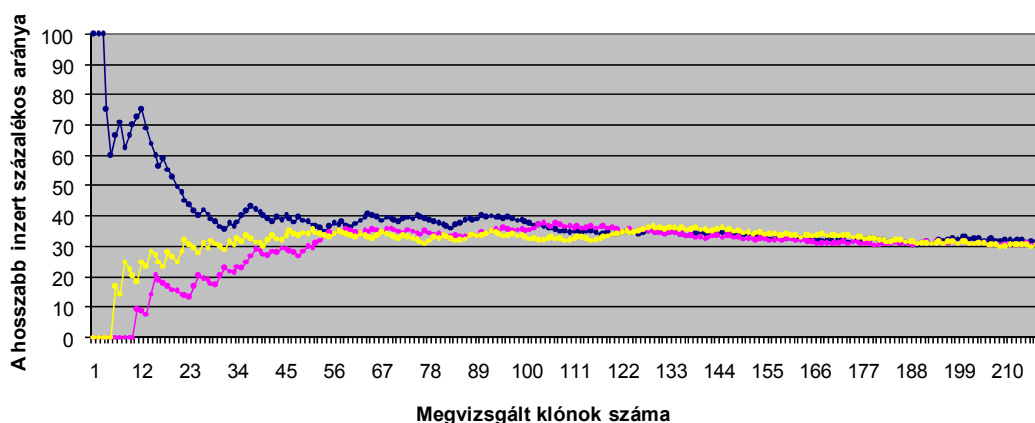
- az ún. kék-fehér szelekció alapján pedig ki lehet választani a rekombináns plazmidot tartalmazó *E. coli* sejtekből kialakult telepet. Az inzert egy β -galaktozidáz génbe épül be, így a telepet alkotó sejtek nem termelik az X-Gal-t (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid) bontó enzimet, nem szabadul fel az „indolkék” festék.

A klónozás persze a nemtenyésztéses diverzitásvizsgálat újabb hibaforrása. A legelső kérdés mindjárt, hogy hány klónt kell "feldolgozni" ahhoz, hogy a diverzitásról hű képet nyerjünk. A 8. ábrában bemutatott esettanulmány szerint a klónozás során nyert pozitív telekepet nagyon nagy számban kell izolálni ahhoz, hogy reprezentatív - vagyis a filospécieszek teljes spektrumát lefedő - klónkönyvtár birtokába jussunk, ahol ráadásul az egyes filospécieszeket reprezentáló klónszám arányos a filospéciesz 16S rDNS kópiaszámával a PCR termékben. A görbe alakulása egyébként kísértetiesen hasonlít a tenyésztéses eljárásokat jellemző grafikonhoz, csak ott a tengelyeken a klónok helyett a vizsgált törzsek száma áll, míg a filospécieszt (nem kötelezően) a taxospéciesz váltja. Saját vizsgálataink szerint (Sváb, 2008), csak 2 komponensű PCR termék esetén is mintegy 150 klón elemzése ad mennyiségi tekintetben is megbízható eredményt (9. ábra). Vagyis egy komplex minta elemzésénél több ezer klón tovább vizsgálata lenne ajánlott. Sajnos laboratóriumunkban erre sosem volt lehetőség (ez zömében pénzkérdés).



8. ábra. Két talajminta (kontrol és cinkkel szennyezett) diverzitásvizsgálata során az elemzett klónok száma és a kimutatott genospécieszek száma között kapott összefüggés. A pontozott vonal az elméleti számítással nyert görbét ábrázolja, amely gyakorlatilag egybeesik a tapasztalattal. Mindkét görbe 250 klón elemzése után még "messze van" a telítéstől (Hill és mtsai, 2003 nyomán).

A klónozás további hibái nyilvánvalóan a folyamat kulcslépésével, a ligálással kapcsolatosak. Ennek vizsgálata sokkal hiányosabb, mint a PCR során fellépő torzulások kutatása. Az eddigi irodalmi hivatkozások csak a probléma jelenlétére utalnak (Rainey és mtsai, 1994). Tapasztalati tény, hogy az inzert mérete befolyásolja a klónozás hatékonyságát. Nem készült azonban átfogó kutatás arra vonatkozóan, hogy egy kevert, eltérő hosszúságú fragmenseket tartalmazó PCR termék klónozása esetén a fragmenshossznak, a vektor : inzert arálynak, az inzert G+C arányának (tér szerkezetének), a végek melletti DNS szakaszok szekvenciájának stb. milyen szerepe van az inzertálódás hatékonyságában. A klónok között ezenkívül szerepelni fognak még a PCR során keletkező kiméra szekvenciák, bár az eredmények kiértékelésénél ezek jó hatásfokkal kiszűrhetők (Kopczynsky és mtsai, 1994).



9. ábra. Az inzert-arány alakulása a megvizsgált klónok számának függvényében három párhuzamos független klónozási kísérletben (három szín). Az *Aeromonas hydrophila* 1365 bp és a *Bacillus cereus* 322 bp hosszúságú PCR termékét 1:1 arányban kevertük. Kb. 150 klón elemzése után a visszanyert arány már nem változott jelentős mértékben. A rövidebb inzert beépülése gyakoribb (Sváb, 2008).

II.3.1.4. Bázissorrend elemzés

A(z izolált) klónokat a bázissorrend meghatározás megkezdése előtt „rendezni” kell, klónkönyvtárát hozunk létre. Az azonos 16S rDNS inzertet tartalmazó klónokat restrikciós endonukleázokkal történő hasítás és az ezt követő mintázat elemzés módszerével választjuk ki. Erre szolgál az ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis; Massol-Deya és mtsai, 1995), vagy újabban a sokszorta pontosabb T-RFLP elemzés (lásd később). A csoportok reprezentánsait vetjük alá bázissorrend elemzésnek. Megjegyezzük, hogy a klónkönyvtár készítésénél (akár az ARDRA, akár a T-RFLP elemzést használjuk) olyan hibát sohasem találtunk, ahol egy csoportba több filospéciesz is jutott volna. Inkább ellenkezőleg, az előfordult, hogy több csoport is ugyanazt a filospécieszt fogja utóbb a bázissorrend elemzés után adni.

A bázissorrend meghatározás („szekvenálás”) módszere a rendelkezésre álló genetikai analizátor (pl. Applied Biosystems, Beckman Coulter, Helios) működési elvétől és gyártmányától függ ma már és a gyártó által ajánlott kitek segítségével történik. Megjegyezzük, hogy a legutóbb kidolgozott „piroszekvenálási” eljárás (Ronaghi, 2001) olyan olcsóvá tette a módszert, hogy a genomspéciesz (lásd II.2.1. fejezet) fajdefiníció igénye (vagyis 1,5 - 2 Mb-nyi kromoszóma szakasz bázissorrendjének elemzése) sok külföldi laboratóriumban már nagy fajszámok esetében is kielégíthető. A mi esetünkben ugyanakkor leggyakrabban a 16S rDNS génszakasz első mintegy 5 - 600 bázisnyi részét elemezzük csak. A fajok többségében ez a gén legváltozatosabb, filogenetikai szempontból (filospéciesz szintjén) legjobb felbontású része. A teljes gén bázissorrend elemzésére csak az új fajok leírása esetében kerítenek sort általában.

A nyers bázissorrend elemzése során először a Ribosomal Database Project II. (RDP II.) CHECK_CHIMERA programjának (Maidak és mtsai, 1999, ill. 2001, Cole és mtsai, 2003) felhasználásával a PCR, vagy klónozási hibákat zárják ki, majd homológ szekvenciákat keresnek a BLAST algoritmus (Altschul és mtsai, 1997) segítségével a National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) adatbázisában, vagy az ARB programcsomag (Strunk és Ludwig, 1995) segítségével az RDP II adatbázisban (az ARB saját adatbázisában és más adatbázisokban, pl. EzTaxon [Chun és mtsai, 2007]). A fajdefiníció (és az elemzésbe vont szakasz hossza) függvényében a 97 - 99 % feletti homológia értékek identifikációt, fajazonosítást jelentenek. Sokszor nincsen lehetőség a faj azonosítására, ilyenkor legalább a nemzetség szintjén kísérlik meg a rendszertani besorolást.

Kérdéses, hogy a nemzetség (génusz) határa hol húzható meg, vagy kijelölhető-e egyáltalában. Cowan (1978) eredeti megállapítása szerint „genus is one of the basic ranks in the hierarchical systems used in biology, and probably the highest rank with any significance in microbiology. ... it is best considered as a collection of species with many characters in common ... Like the species, the genus is a subjective concept without any foundation in fact.” A filospécieszek korában is „korrekt” ez a nemzetség fogalom, pusztán arra kell törekedni, hogy a nemzetség filogenetikai szempontból „koherens” legyen (Stackebrandt és Woese, 1984; Stackebrandt, 2006). Sok nemzetséget emiatt az elmúlt 20 évben revideáltak, újrarendeztek, de sajnos ez nem történt meg a prokarióták valamennyi génuszára. Túl ezen az egyes nemzetségeket más és más filogenetikai „mélységgel” (sensu Stackebrandt, 1992) határolták le. Ennek következtében a nemzetség szintű besorolás a nemzetségre és a rokon nemzetségekre rendelkezésre álló valamennyi szekvencia filogenetikailag hű rendezését és áttekintését igényli.

Az utóbbi öt évben az előbb jelzett gondoknál sokkal nagyobb is jelentkezett. A vizsgált környezet jellegétől függően, de egyre gyakrabban fordul elő, hogy a homológia keresés eredménye „környezeti nem tenyésztett klón”. Erről pedig a legjobb esetben is csupán annyit tudhatunk meg, hogy milyen habitátból izolálták. Természetesen egy nagyobb „csapat bázissorrend” filogenetikai pozícióját biztosabban lehet meghatározni, de a 6. ábrában bemutatott helyzet (vagyis, hogy sok "divízióban" egyáltalában nem mutattak ki érvényes fajokat, csak genotípusokat; 25. lap) a nemzetségek filogenetikai szintjén még sokkal kiábrándítóbb. Vagyis a környezeti minta fajdiverzitására alapozott közösségi anyagcseréjének feltárása, a működésre vonatkozó következtetések levonása - ilyen esetekben - lehetetlenné válik. E gondok bizonyos fajta megoldását jelentheti az ujjlenyomat eljárások alkalmazása, illetve a metagenomika nyomán kapható eredmények felhasználása. Ma már két olyan teljes genom ismert és annotált, ahol nincs meg a faj ("nem tenyésztették még ki"; Venter és mtsai, 2004; Dupré és O'Malley, 2007).

II.3.1.5. Molekuláris ujjlenyomat eljárások

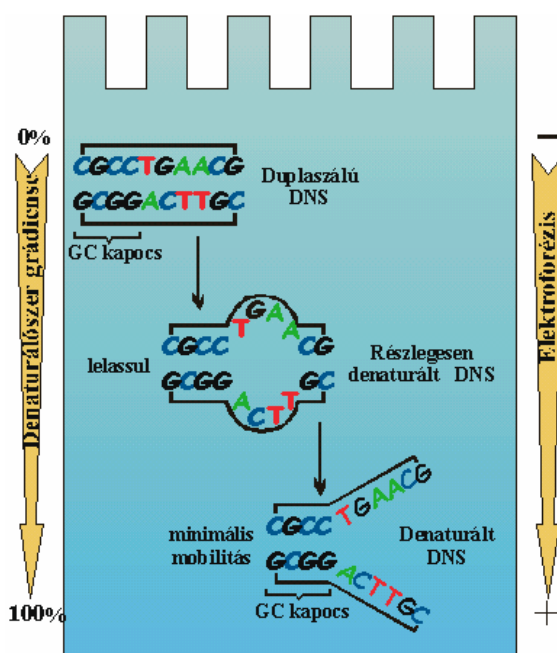
Áttekintve a hagyományos tenyésztési környezeti bakteriológiai elemzések idő és munkaigényét (no meg költségét) azt kell mondjuk, hogy a klónozás és filospéciesz meghatározásra alapozott munka sem sokkal rövidebb időt, kevesebb munkát (és főképpen pénzt) igényel. Ha ezt ráadásul összevetjük a mikrobiális ökológia természetes kíváncalmával, hogy a közösség idő és térbeli változatosságát is megismerjük az időigény sokszorosára nő. Gondoljunk csak bele pl. egy olyan esetben, amikor egy eleveniszapos medence mikrobiótájának környezeti hatásokra történő megváltozását kell elemezni, ahol a tartózkodási idő 3 óra. Vagyis a változások nyomonkövetéséhez (akár napok hosszatt) 10 - 20 percenként vett mintákat kellene elemezni és ekkor a térbeli heterogenitásra még csak figyelmet sem fordítottunk. Ez esetben egy-egy fajról a "van / nincs", vagy "sok van / alig van" (belőle) információ is hihetetlen fontos lehet. A hagyományos tenyésztési mikrobiológiai megközelítés a szelektív táptalajok alkalmazásával történő csíraszámolás lehet (pl.). A nemtenyésztési eljárások esetén a molekuláris ujjlenyomat technikák kínálják filotípusok sokaságának pontos minőségi, ill. mennyiségi nyomonkövethetőségét, kiegészítve azzal az információval, hogy az illető szervezet aktív anyagcserét folytat-e (RNS alapú megközelítés). Természetesen igaz ez - viszont - adott időpontra vonatkozó térbeli heterogenitás feltárására is. Hozzá tehetjük még a fentiekhez, hogy a filotípusok filospéciesz szintű azonosítása is megoldható a legtöbb esetben vagy közvetlenül (a kritikus filotípusok bázissorrend elemzésével), vagy közvetve a mintából ké-

szült klónkönyvtár elemzésre alapozva, ill. „in-silico”, vagyis számítógépes adatbázisok segítségével hívásával.

Ellentétben a klónozással, ahol a közösséget reprezentáló vegyes amplikont egyesével "fajtázzuk szét" és elemezzük, a molekuláris ujjlenyomat eljárások esetében az egy-egy taxonból nyert teljes amplikontömegeket választjuk el (és jellemezzük), ezek adják a mintázatot. Ezért is lehetséges mennyiségi következtetések levonása is. Az elválasztás történhet az amplikonok "pontos" mérete alapján (pl. T-RFLP), vagy pedig G + C arány és konformáció szerint (pl. DGGE, SSCP). (De ujjlenyomatot adhat egy hibridizációs mintázat is.) A 7. ábrán (26. lap) öt eljárás rövidítését tüntettük fel, a bakteriológiában ezek között is a DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis) és a T-RFLP (terminális restrikciós fragmens hossz polimorfizmus) alapú elemzés a leggyakoribb. A 10. ábrán az eredetileg pontmutációk kimutatására kidolgozott és Muyzer és Smalla (1998) által környezeti mikrobiológiai célokra adaptált DGGE működésének elvét látjuk. A többé-kevésbé azonos hosszúságú (lásd a II.3.1.3. fejezetet) multitemplát PCR terméket az amplikonok GC aránya szerint, „olvadási jellegzetességeikből” adódó konformáció változásaik alapján választjuk szét (miközben a DNS két szálát a primerrel bevitt GC gazdag régió [GC kapocs] továbbra is összetartja). Míg a DGGE-ben a denaturáló szer (úrea, formamid) grádiense szolgálja a szétválasztást, a TGGE (hőmérsékleti gradiens gélelektroforézis) esetében a gélben (vagy gyakrabban futás közben, időben) biztosított hőmérsékleti gradiensben történik a kétfonális DNS szétválása. Ekkor futása lelassul, szinte teljesen leáll és a GC kapoccsal összetartott "megolvadt" DNS-ek a gélben „csíkba tömörülnek”.

A nagyon hamar népszerűvé vált eljárással környezeti mintákban a közösségszerkezet tér-időbeli változásait, szennyezésekre adott válaszait stb. vizsgálták (pl. Muyzer és mtsai, 1995; Ferris és Ward, 1997; Santegoeds és mtsai, 1998; Torsvik és mtsai, 1998; Borsodi és mtsai, 2004; Székely és mtsai, 2008; Vladár és mtsai, 2008). Meg kell jegyezzük, hogy az eljárás kimutatási határa csak a domináns (ill. a PCR termékben domináns) fajok (filospécieszek) kimutatására alkalmas és még a legváltozatosabb faji spektrum mellett is a megkülönböztethető csíkok mennyisége legfeljebb 50 körüli. Így azután sok a mintában talán kisebb egyedszámban jelenlevő, de a közösségi anyagcserét illetően fontos szervezetet nem mutatunk ki, sőt a PCR torzításait figyelembe véve még a kimutatottak körében is kritikus lehet a mennyiségi arányok kérdése (von Wintzingerode és mtsai, 1997; Suzuki és mtsai, 1998). E problémakör megoldása csak filospéciesz specifikus eljárásokkal lehetséges (pl. Kowalchuk és mtsai, 2000; Boon és mtsai, 2002) akár a DGGE esetében, akár pedig más eljárást alkal-

mazva. Elsősorban a hibridizációs technikák segítségével hívása (Amann és Schleifer, 2001) jöhet szóba.

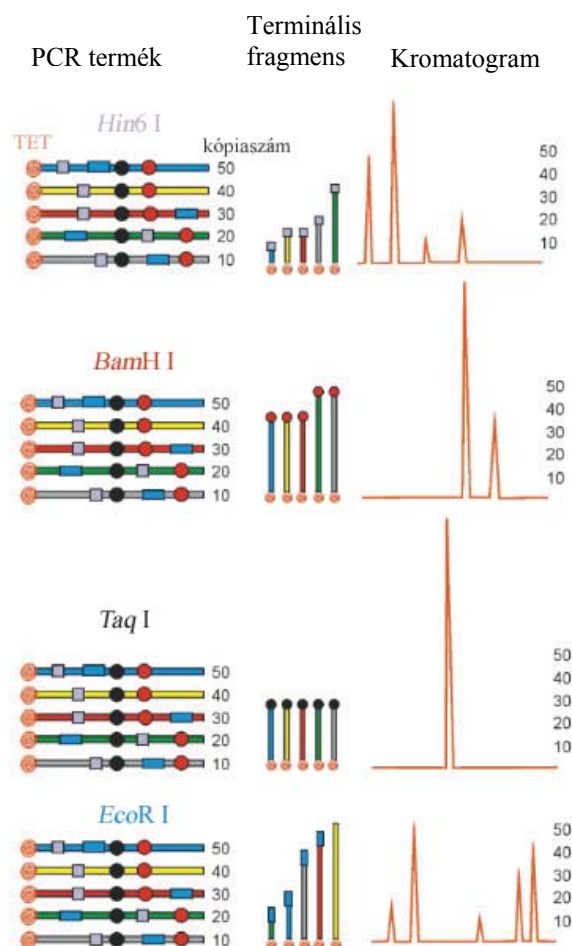


10. ábra. A denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) működésének elve.

Ezt az előbbieken jelzett „mennyiségi korlátot” a T-RFLP eljárás alkalmazásával elkerülhetjük annak sokszorta jobb érzékenysége miatt. A T-RFLP elvét a 11. ábrában mutatjuk be (Liu és mtsai, 1997; Osborn és mtsai, 2000). A közösségi nukleinsavból végzett, kronométergénre specifikus PCR reakcióban az egyik primert fluoreszcensen jelölik. A termék restrikciós emésztése a hasító helyek eltérő elhelyezkedése miatt más-más méretű terminális (jelölt) fragmenst fog adni. A fragmensek szétválasztását nagy felbontású eljárással, újabban leggyakrabban kapilláris elektroforézissel végzik (pl. ABI Genetikai Analizátor, „gene-scan” üzemmód), ahol a fluoreszcensen jelölt fragmensek detektálása ~500 bázispár hosszúságig $\pm 0,5$ bázisnyi pontossággal lehetséges. Természetesen a méret meghatározáshoz a mintával együtt ún. belső standardokat is kell futtatni (ezek fluoreszcens jelölése értelemszerűen eltér a mintáétól). A primer kötési helye és a restrikciós enzim hasítási helyének ismeretében a terminális fragmens hosszakhoz filotípusok rendelhetők (filotípusok) és a görbe alatti terület pedig az egyes filotípusok mennyiségi arányaira enged következtetni. Az eredményt „szemikvantitatívnak” szokták jellemezni, hiszen a PCR torzításait (lásd II.3.1.2. fejezet) tükrözi.

A T-RFLP faji szintű felbontása a nagy pontosságú fragmentum hossz meghatározása ellenére relatíve csekély, hiszen különböző fajok 16S rDNS-ének adott enzimmel történő rest-

restrikciós emésztése eredményezhet azonos méretű fragmenst. A felbontást több restrikciós enzim használatával pontosíthatjuk, de a csúcsok jó része még így is azonosíthatatlan lesz. Az ok jó esetben egy-egy új filotípus jelenléte. Az azonban nyilvánvaló, hogy alkalmazásával a közösség szerkezet változásait akár nagyon sok minta esetében is nagy felbontással tudjuk követni.



11. ábra. A terminális restrikciós fragmens hossz elemzés (T-RFLP) módszerének vázlata. A terminális fragmentumok detektálásával nyert kromatogramokon jól látható, hogy a diszkrét csúcsok elhelyezkedése a terminális fragmentum hosszától, a görbe alatti területek a terminális fragmentum kópiaszámától függenek.

Az SSCP (egyfonalas DNS konformációs polimorfizmusa; single-strand conformation polymorphism) elemzést Schwieger és Tebbe (1998) alkalmazta először mikrobiológiai közösség elemzésre. Az eljárás során a közösségi kétfonalas PCR termék egyik szálát speciális nukleázzal eleméssztik (pl. mungó-bab [arany-bab] nukleáz). Az így nyert egyfonalas DNS-t natív körülmények között elektroforetizáljuk nagyfelbontású (pl. kapilláris) rendszerben. Az egyes csúcsok a különböző térszerkezetek alapján jönnek létre. Az eredetileg mutációk ki-

mutatására kidolgozott eljárás alkalmazása meglehetősen körülményes a mikrobiális ökológiában. Számos hibája is van, azonban ezek precíz elemzése - miután az eljárás nem terjedt el - még várat magára. Az LH-PCR (hossz heterogenitási PCR, Suzuki és mtsai, 1998) módszer lényege, hogy eleve megfelelő hossz-heterogenitással rendelkező (pl. ITS régiókat tartalmazó) kromoszóma szakaszokat szaporítanak fluoreszcensen jelölt primerrel, az elválasztást pedig nagyfelbontású (pl. kapilláris) elektroforézissel végzik.

Az ujjlenyomat elemzések tehát filotípusok jelenlét-aktivitás mintázatainak (térben, időben) kimutatására alkalmasak. Segítségükkel nagyszámú minta gyors elemzése válik megoldhatóvá. A módszerek legfontosabb hiányossága, hogy az elemzést megelőzi egy nukleinsav szaporítási lépés, amely az eredmények mennyiségi értékelését kétségesse, kritikussá teszi.

A domináns és aktív baktériumok nagyobb élettani csoportjainak talán legpontosabb mennyiségi meghatározási hagyományos módszere a légzési kinon / zsírsav metilészter alapú kemotaxonómiai elemzés.

II.3.2. A baktériumsejtek lipid összetevőinek kivonásán alapuló környezeti bakteriológiai eljárások

A taxospécieszek, vagy fenospécieszek rendszertanában az 1970-es '80-as évektől kezdve egyre jelentősebb szerepet játszott a kemotaxonómiai bélyegek alkalmazása. Mind a mai napig új fajok leírása esetében kötelező megadni (vagyis az ún. minimum kritériumok körébe tartozik) a sejtfal szerkezetből a murein (peptidoglikán) keresztkötéséért felelős diamino-, vagy dikarbon-aminosavat (Gram-pozitív szervezet esetében a teljes keresztkötő szerkezetet akár), valamint a sejtmembrán lipid alkatrészeit „zsírsavprofil” (Tornabene, 1985) és „izoprenoid kinon” (Collins és Jones, 1981) szintjén (pl. Tóth és mtsai, 2008). Mivel egyértelművé vált, hogy a zsírsavprofilra akár faji szintű határozó kulcs építhető, valamint a kinonok esetében hasonló felbontás tapasztalható az aktinobaktériumok körében (és az éter lipideket illetően az Archaea doménben; Bai és Zelles, 1997), automata identifikációs rendszert is készítettek (Erola és Lehtonen, 1988), amely kereskedelmi forgalomba is került (Sherlock Microbial Identification System).

Az egyes mikroorganizmusok lipid profilja azonban erőteljesen függ a környezeti feltételektől, vagyis akár az izoprenoid kinon alapú, akár a zsírsav metilészter alapú fajazonosítás alap követelménye a törzseknek „szabványosított” körülmények között történő tenyésztése. Teljesen nyilvánvaló pl. hogy egy tág hőmérsékleti toleranciával rendelkező baktérium 10 °C-on szaporítva membránjában jóval több elágazó és telítetlen zsírsavat fog tartalmazni,

mint ugyanaz a szervezet 40 °C körül tenyésztve. Ezen a hőfokon feltehetően több lesz a telített zsírsavak aránya. Hasonlót mondhatunk el a légzési kinonokról: nagy oldott oxigéntartalom mellett tenyésztett baktérium tenyészet kinon profilja el fog térni a nitrát légzésre „kényszerített” párhuzamos tenyészetétől. Baktériumfajról baktériumfajra változik, hogy zsírsav, ill. kinon típusa mennyire állandó, ill. hogyan módosul környezeti hatásokra. Ráadásul az erre vonatkozó kutatások száma meglehetősen csekély. Mégis nő azoknak a környezeti mikrobiológiai elemzéseknek a száma, amelyben valamelyik kemotaxonómiára alapozott eljárást tenyésztési és nukleinsav alapú módszerekkel párhuzamosan alkalmaznak. Zelles László és Laczkó Endre magyar származású kutatók munkássága alapján (Zelles és Bai, 1993; Laczkó és mtsai, 1997) a baktériumközösség és a közösségi anyagcsere jobb megismerésére nagyon sok példát ismerünk (pl. Hirashi és mtsai, 1991; Zelles és mtsai, 1992; Bardgett és mtsai, 1996; Boon és mtsai, 1996; Fujie és mtsai, 1998; Schlöter és mtsai, 1998; Gattinger, 2000; Widmer és mtsai, 2001; Halbritter és Mogyoróssy, 2002; Gattinger és mtsai, 2002; Tóth és mtsai, 2004; Halbritter, 2005). A foszfolipid zsírsavelemzés indikációs lehetőségeit Zelles (1999) nyomán a 7. táblázatban mutatjuk be. Az eljárás korlátait jelentős mértékben növeli az az előzőekben már többszörösen dokumentált tény, hogy a környezeti minták baktérium népszerűségének legfeljebb 1 %-a ismert faji szinten. Magyarán a lipid analízisből levont következtetések azt az ismeretlen 99 %-ot jellemzik az ismert 1 % ökofiziológiájának töredékes leírására alapozva.

A környezeti mikrobiológia eszköztárából a megválaszolatlan kérdésekre történő válaszadás lehetőségeként az oligonukleotid hibridizációs eljárások maradtak.

II.3.3. Az oligonukleotid hibridizációs eljárások haszna a környezeti mikrobiológiában

Habár a nukleinsav hibridizációs technika már nagyon korán a rendszertan alapvető eljárásává vált (Marmur és Lane, 1960; Mandel, 1969) és a fajdefiníciót 30 éve erre alapozzák (Wayne és mtsai, 1987), valódi fontosságát és környezeti mikrobiológiai alkalmazhatóságát csak az elmúlt 10 év hihetetlen fejlődése mutatta meg (Amann és Schleifer, 2001). Két oka is van ennek. Az egyik nyilvánvalóan a 16S rRNS adatbázis (RDP II.) és általában a teljes genom programok hihetetlen méretű bővülése, vagyis a cél, illetőleg próba szekvenciák (oligonukleotidok) rendelkezésre állása. A másik pedig a technikák egy részének a „kommercializálódása” és miniatürizálása („genom on a chip”). A környezeti mikrobiológiai felhasználhatóság és információtartalom szempontjából pedig talán a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) hozta a legtöbb újdonságot (Amann és mtsai, 1990.a; és b, Hartmann és mtsai, 1998). Ugyanakkor - legalábbis a környezeti mikrobiológiában - a „csip technológiák”

használata csak lassabban halad előre és sok közlemény jelenik meg a nehézségek okáról (pl. Alm és Stahl, 2000; Wu és mtsai, 2001; Loy és mtsai, 2002; Wilson és mtsai, 2002; Kyselková és mtsai, 2008).

Az (oligo)nukleotid próbák rövid (15 - 10 000 bázis) egyfonalas nukleinsav szakaszok, amelyek hozzá tudnak kötni a más forrásból származó komplementer nukleinsavhoz. Ezzel a hibridizációnak nevezett folyamattal a célszekvenciák elsődleges szerkezetét detektáljuk, amely környezeti hatásoktól (gyakorlatilag) független szemben az „expresszált fenotípussal”.

Jelölés	Elnevezés	Előfordulás, indikációs lehetőség
PLFA	foszfolipid-zsírsavak	biomassza
SATFA	telített észterkötésű zsírsavak	Bacteria, Eukarya
-	egyenes láncú	Bacteria, Eukarya
i-, a-, Me-	elágazó láncú	Gram-pozitív baktériumok; szulfát-redukálók, <i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i>
-c	ciklopropil	Gram-negatívok, <i>Clostridium</i> , <i>Bifidobacterium</i>
MUFA	egyszeresen telítetlen észterkötésű zsírsavak	
16:1 ω 6	16-os lánc hossz, 1 kettős kötés a láncvégtől 6. helyen	I-es típusú metanotrófok
18:1 ω 8	18-as lánc hossz, 1 kettős kötés a láncvégtől 6. helyen	II-es típusú metanotrófok
PUFA	többszörösen telítetlen észterkötésű zsírsavak	Eukarya, cianobaktériumok
PLOH	észterkötésű hidroxil-szubsztituált zsírsavak	
α	-OH a karboxilcsoport melletti 1. szénatomon	Gram-negatívok, Actinobacteria
β	-OH a karboxilcsoport melletti 2. szénatomon	<i>Mycobacterium</i>
ω	-OH a karboxilcsoporttól leg-távolabbi szénatomon	Gombák
myl	mikolsavak (β -hidroxil, α -el-ágazás)	Actinobacteria
UNSFA	nem észterkötésű zsírsavak	Anaerób baktériumok
UNOH	nem észterkötésű hidroxil-szubsztituált zsírsavak	Anaerób baktériumok
α	-OH a karboxilcsoport melletti 1. szénatomon	<i>Sphingomonas</i> , <i>Candida</i>
β	-OH a karboxilcsoport melletti 2. szénatomon	<i>Bacterioides</i> , <i>Flavobacterium</i>
myl	mikolsavak (β -hidroxil, α -el-ágazás)	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>

7. táblázat. Jellegetes PLFA-típusok, jelölésük és indikációs lehetőségeik. Az egyes nagyobb lipid frakciókat vastagon szedtük (Zelles, 1999 nyomán).

Vagyis genotipikai eljárás, amely a célgének függvényében egyfajta "molekuláris szonda-ként" alkalmas fajok és egyéb filogenetikai csoportok kimutatására, de hasonlóképpen anyag-

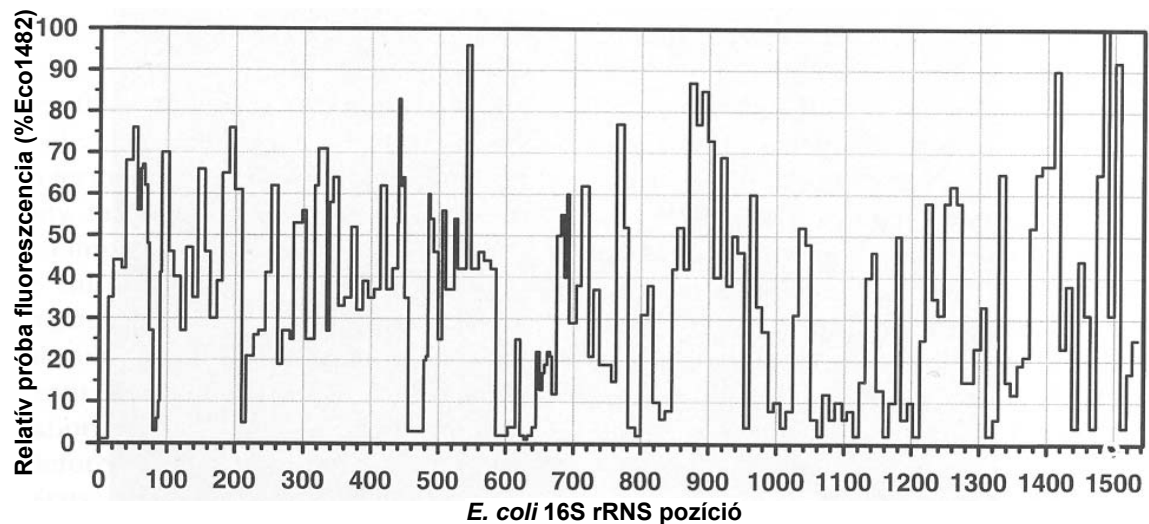
csere-folyamatok potenciáljának detektálására. Az első esetben a 16S rDNS, vagy 16S rRNS (esetleg más kronométer gének) lehet a cél, az utóbbi esetben pedig egy-egy funkciógén, vagy az arról átírt mRNS. (Azért csak az anyagszere folyamatok potenciálját detektáljuk, mert a gén megléte nem jelenti azt, hogy az átírás is megtörténik, valamint adott nagymennyiségű mRNS jelenléte egy sejtben még nem jelenti biztosan, hogy arról fehérje szintetizálódik és az aktív lesz.) A DNS, ill. az RNS cél szekvencia esetében fel kell hívnunk a figyelmet a lényeges mennyiségi különbségekre. Míg sejtenként a 16S rDNS gén 1 - 14 kópiában lehet jelen (Farely és mtsai, 1995), a 16S rDNS kópiaszáma egy aktívan szaporodó sejtben 10^4 - 10^5 is lehet (Amman és Schleifer, 2001). A *Mycobacterium tuberculosis* esetén 10^2 - 10^3 rRNS található sejtenként, míg pl. az *E. coli*-ban 10^4 - 10^5 molekula.

Az oligonukleotid próbák használatának elvi menetét a következőkben foglalhatjuk össze:

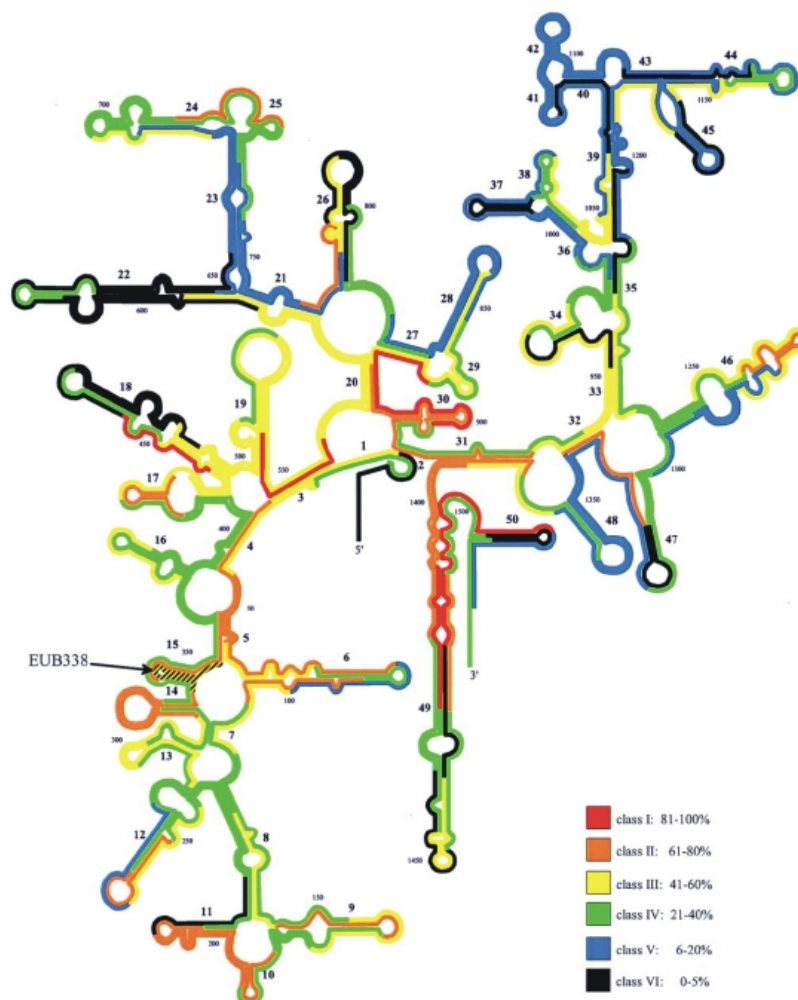
- a próba megtervezése, előállítása és jelölése,
- a cél nukleinsav „feltárása”, hibridizációra alkalmas állapotba hozása,
- hibridizáció,
- az eredmény detektálása és értékelése.

A próbák tervezése az egész folyamat leginkább kritikus része (Giovannoni és mtsai, 1988). Nagyon sok csoport specifikus próba vásárolható, mégis filospécieszek kimutatása esetén a próbatervezés alighanem a kutató saját feladata lesz. A nehézség érzékeltetésére csak egyetlen példát hozunk itt fel: egy filospéciesz 16S rDNS-ére specifikus próbát tervezünk, amely 18 bázis hosszúságú és ezzel kívánunk egy vegyes (pl. talaj eredetű) mikrobaközösség DNS-ében a filospéciesz jelenlétre kémlelni. Sajnos a hihetetlen méretű bázissorrend variabilitás miatt még a legszigorúbb feltételek esetén is előfordulhat, hogy egy nem riboszómális RNS gén egy szakasza pl. 1 - 2 hibával célszekvenciaként szolgálhat. Ha pedig ez a szerkezet a mintában tömeges előfordulású ... (Grimont és mtsai, 1985). A próba egyébként készülhet oligonukleotid szintézissel, vagy hosszabb próba esetén molekuláris biológiai eljárással, pl. PCR segítségével, specifikusan kiválasztott szekvenciákból (Schmiedhuber és mtsai, 1988). A 16S rRNS in situ hozzáférhetőségét a próbák számára a 12-13. ábrákon mutatjuk be. A próba jelölése sokféle lehet (pl. radioaktív, kemolumineszcens) ma legtöbbször a fluoreszcens direkt (vagyis a próbán történő) jelölés a szokásos.

A cél nukleinsav sejtekbe zárt, ezért vagy ki kell azt vonni a sejtekből, vagy a sejteket kell a próba számára átjárhatóvá tenni, amint az az in situ hibridizációnál történik. A hibridizáció folyamatát lehetőség szerint a legszigorúbb körülmények között kell végezni. A feltételeket a próba olvadási tulajdonságai (Ezaki és mtsai, 1989) határozzák meg, amit az



12. ábra. A 16S rRNS in situ elérhetősége az *E. coli* esetében (Amann és Schleifer, 2001).



13. ábra. 200 oligonukleotid próba elhelyezkedése (18-mer, eltolás: 5-13 nukleotid) az *E. coli* 16S rRNS sematikus harmadlagos szerkezetén. A színek az elérhetőséget mutatják (Amann és Schleifer, 2001 nyomán).

alkalmazott oldatok ionerősségével, denaturálószer tartalmával, illetve a reakció hőfokával lehet finoman szabályozni. A hibridizáció történhet folyadék fázisban, bár ma legtöbbször membránokhoz kötve zajlik, ill. „csipek” esetén üveg felületen. A kivitelezést illetően a szokványos eljárás során a cél nukleinsavat rögzítjük pl. membránra és hozzuk össze a próbával. A fordított (reverz) eljárásnál a próbát rögzítik a felületre és a célszekvenciák vannak az oldatfázisban. Így oldható meg csupán a „mikrorendek” (DNS array) esetében szokásos hihetetlen „információ sűrűség” elérése: pár négyzetcentiméternyi üvegfelületen több ezer próba található precíz elrendezésben.

A kiértékelés a direkt, vagy indirekt jelölés függvényében hagyományos eljárásokkal (pl. fotometria, denzitometria, luminometria), vagy a FISH és a „mikrorendek” esetében fluoreszcens mikroszkóppal (akár konfokális lézer szkennning technikával) történik, ill. gyakran nagy felbontású szkennerek segítségével. Gyakorta kettős, vagy többes (általában 5 különböző próbáig lehet sikeres) jelölést alkalmaznak, ahol különböző hullámhosszokon értékelnek. FISH esetén a felvett képeket elektronikus képfeldolgozás segítségével „montírozzák” egybe.

A környezeti bakteriológiában a közösségek valós szerveződésébe talán a FISH technika segítségével tekinthetünk be. Egy-egy jól sikerült FISH preparátummal nemcsak egyes filospécieszek számát állapíthatjuk meg a mintában, de azok pontos elhelyezkedését a többi baktérium, vagy eukarióták vonatkozásában, sőt megfelelő többes jelölések esetében bizonyos anyagcsere aktivitások potenciálját (pl. *NifH* gén jelenléte feltételesen N_2 kötő aktivitást jelent) is megbecsülhetjük (pl. Kovács, 2002; Halbritter, 2005; Török és mtsai, 2008). A molekuláris filogenetika eredményei mára a mikroszkópia reneszánszát hozták el a bakteriológiában.

III. A KUTATÁSOK CÉLKITŰZÉSEI

Megy-é előbbre majdan fajzatom,
Nemesbedvén, hogy trónodhoz közelgjen,
Vagy, mint malomnak barma, holtra fárad,
S a körből, melyben jár, nem bír kitörni?"
(*Madách Imre: Az ember tragédiája*)

A fenti idézetben megfogalmazott kérdések a Paradicsomból való kiűzetést már-már elfogadó Ádám teszi fel az Úrnak. E kérdéssel azonban minden embernek szembesülnie kell. A kutatói munkát élethivatásának választó embernek különös figyelemmel kell válaszolnia a kérdésre. Mély meggyőződésem, hogy a mikrobiológia tudománya az elmúlt negyed évszázadban a Watson és Crick (1953) által megjósolt, DNS-ben rejtett különös információk („This structure has novel features which are of considerable biological interest.”) felhasználásával hihetetlen sebességgel "ment előbbre". Ennek a fejlődésnek a környezeti bakteriológiára gyakorolt hatását kívánom bemutatni saját munkám / munkáink alapján. A különféle - legtágabban értelmezett - magyarországi vizes élőhelyek biodiverzitás vizsgálata az a közeg, amelyben a molekuláris biológiai eszköztár alkotó felhasználásával nyerhető információ többletet demonstrálok.

- Elsőként végigjárjuk azt az utat, amelyet a környezeti mikrobiológia megtett a mikroszkópos és tenyésztésre alapozott csíraszámbebecsléses eljárások alapján a környezetünkről kialakítható képtől a hagyományos, törzsek izolálásán és jellemzésén alapuló módszerekkel elérhető tudáson keresztül a ma - hazánkban több helyen - rutinszerűen alkalmazott, közösségi nukleinsav kivonásra épülő, filospécieszekkel dolgozó technika nyújtotta lehetőségekig. Ezenközben bemutatom az egyes módszerek alkalmazásának korlátait, esetleges hibáit és a segítségükkel elérhető ismeretek mélységét, a vizsgált élőhelyek fajszerkezetét és közösségi anyagcsere diverzitását illetően. Céлом, hogy bemutassam az egyes technikai korlátok meghaladásának, leküzdésének lehetséges irányait és a hibák elkerülésének útjait.

- A következő részben célul tűztem ki a nemtenyésztéses eljárások alkalmazott környezeti bakteriológiai, biotechnológiai hasznának bemutatását. A természet erőforrásainak ma még alig feltárt részét képező mikrobiális aktivitásokat gyakorta évszázados tapasztalatok alapján a nélkül használjuk, hogy a pontos működést ismernénk. Ilyen a "vizek öntisztulásának" folyamata, amelyre több környezeti biotechnológia is épül (pl. szennyvíztisztítási technikák, vagy a parti szűrősű ivóvíz előállítás). A technológiai folyamatok kulcslépéseit (pl. az eleveniszapos medence) az üzemeltető legtöbbször afféle fekete dobozként kezeli, csak az érdekli, hogy a

kívánt változások megtörténjenek (pl. a víz tisztuljon meg), de nem érdekli az, hogy ez hogyan történik. Bemutatom, hogy a technológiák hagyományos fizikai, kémiai paraméterekre alapozott működtetése, irányítása a "fekete doboz" mikrobiális faj és anyagcsere diverzitásának feltárásával javítható, az üzemvitel optimálásának alapfeltétele a mikrobiológiai folyamatok megismerése, megértése.

- Korunk molekuláris biológiai laboratóriumi technológiáinak a pusztán "felhasználói szintű" alkalmazása is gyakran szellemi kihívást jelent. Két alapvető szintje is van a kihívásnak, az egyik magának a biológiai folyamat működésének a pontos megismerése, a másik pedig a folyamatot nyomon követő észlelőrendszer működésének pontos megismerése. Ezek nélkül gyakorta nem értjük meg a kapott eredményeket, nem tudjuk a nyert adatok hibáját stb. Ezért azután harmadik célom, hogy bemutassam, hogy több területen a "művelt felhasználó" szintjét meghaladva alkotó módon járulok - járulunk hozzá a környezeti mikrobiológia eszköztára használatához, különösen a közösségi nukleinsav alapú eljárások alkalmazásának optimalizálásával.

- A diverzitáskutatás lényeges eleme a fajok azonosításán túl új fajok izolálása és leírása. A mikrobiológia tudományának az egyik legtöbb kérdést felvető területe a fajfogalom, különösen a fajleírás jövőjét illetően. Célom a konszenzusos fajdefinícióra alapozott polifázikus fajleírás demonstrálása és az új fajok tenyésztetbe vonása (és az ahhoz ma szabályszerűen csatolt törzsgyűjteményi munka) hasznának és korlátainak bemutatása.

IV. ANYAG ÉS MÓDSZER

IV.1. Mintavétel

Mintáink egy része természetes környezetből, az ország különböző pontjain kijelölt mintavételi helyekről származott. A mintavétel más esetekben szennyvíztisztítóban, vagy laboratóriumi kísérleti rendszerekben történt. A természetes környezeti mintavételi helyeket és a szennyvíztisztítókat a 14. ábrán mutatjuk be. A mintahelyek és a mintavételi módszerek leírását pedig a következőkben adjuk.

IV.1.1. Mintavétel az Óhalászi-Holt-Tiszán

Az Óhalászi-Holt-Tisza a Kiskörei-víztározó Poroszlói-medencéjében, természetvédelmi területen található. Az erősen görbült, ív alakú egykori folyómederszakasz átlagmélysége 2,8 m, legmélyebb pontja 5 m. A Holt-Tiszát a tározó víztestével csupán egy sekély (0,8 m mély) csatorna köti össze, vízutánpótlását ezen keresztül nyeri. A tározó teljes leürítése esetén is a holtág legmélyebb pontján kb. 4 m mélységű vízállás jellemző. A víztérnek kb. 75 %-ában található makrovegetáció, amely főleg felszínen kiterülő, úszó és/vagy gyökerező hínárnövényzet foltokban (nyíltvíz, alámerült hínárnövényzet, mocsári növényzet; Dévai, 1997). Az Óhalászi-Holt-Tisza legmélyebb pontján kijelölt mintavételi hely GPS módszerrel meghatározott földrajzi koordinátái: északi szélesség 47°35'12''; keleti hosszúság: 20°40'48''.

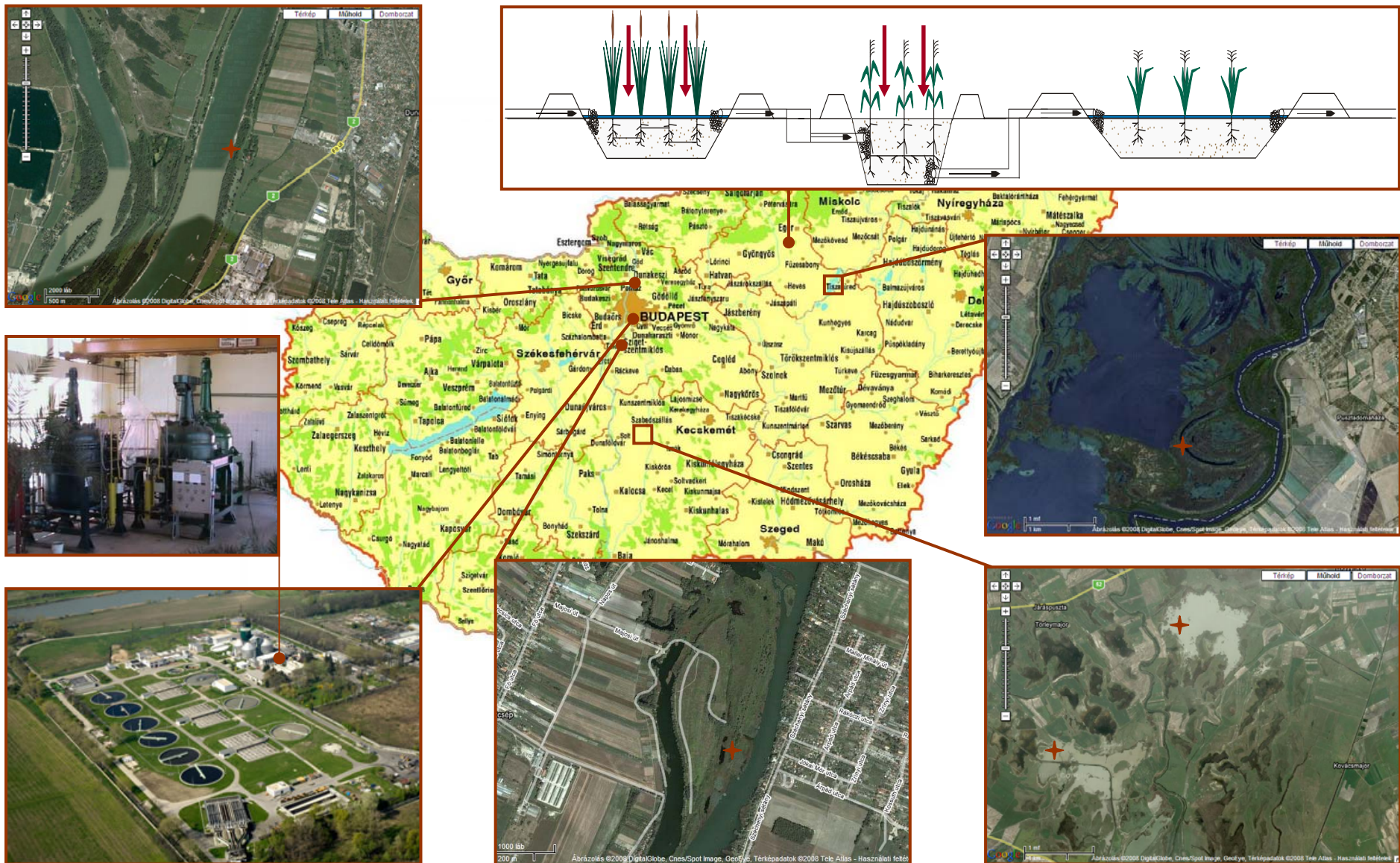
2000 - 2004. között összesen 15 alkalommal végeztünk rétegmintavételt. A mintavételek évszakos megoszlása a következő volt: négy tavaszi (2001. május 07., 2002. április 02., 2003. május 05., 2004. március 22.), öt nyári (2000. június 14., 2001. július 30., 2002. július 23., 2003. augusztus 24., 2004. augusztus 16.), négy őszi (2001. október 23., 2002. október 10., 2003. október 14., 2004. október 12.) és két téli jég alóli (2002. január 10., 2003. március 04.). Az Óhalászi-Holt-Tisza vizéből a rétegmintavételt minden esetben egy erre a célra készített kis teljesítményű szivattyú segítségével végeztük, amelyet a mérőszondához csatlakoztattunk. 25, illetve 50 cm-enkénti rétegekből vízmintákat hoztunk a felszínre kémiai és biológiai laboratóriumi feldolgozásra.

A helyszíni méréseket WTW (Weilheim, Németország) és Hydrolab DataSone 4 (Hach, Loveland, USA) vízminőségvizsgáló helyszíni szondákkal végeztük 10 cm-enként lefelé haladva a következő adatokat regisztráltuk: víz hőmérséklet, pH, oldott oxigéntartalom, oxigéntelítettség, elektród (redox) potenciál, elektromos vezetőképesség és (2003-tól) fényklíma.

IV.1.2. Mintavétel a szigetcsépi úszólápon

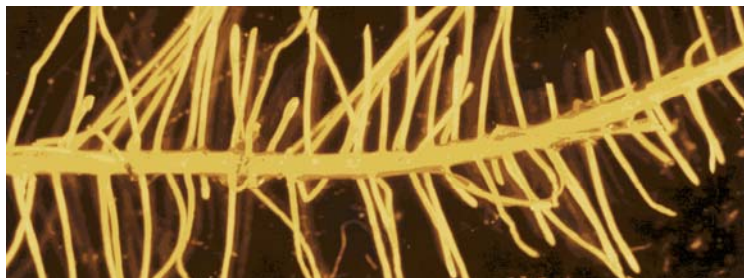
Mintavételi helyünk a Szigetcsép melletti Csupics-sziget úszólápvilágának egy nagy kiterjedésű (20 m x 100 m) gyékényes sávja, amelyet egyik oldalról a part, másik oldalról egy rekettyefűzes (*Salix cinerea*) úszóláp határol. A mintavételi hely földrajzi koordinátái: északi szélesség 47°15'51''; keleti hosszúság: 18°59'10''. A gyékényes állományt gyakorlatilag csak a keskenylevelű gyékény (*Typha angustifolia* L.) borította, így növényi kölcsönhatásoktól mentesnek tekinthető a rendszer. A lápi átalajba ágyazott gyökérszónából ásóval 30 x 30 x 40 cm-es, gyökereket és rizómákat tartalmazó tömböt emeltünk ki, amelyet a laboratóriumba az eredeti helyről származó lápvízben szállítottunk. A mintavétellel párhuzamosan a helyszínen meghatároztuk az alapvető vízfizikai és kémiai paramétereket (hőmérséklet, pH, elektród (redox) potenciál, oldott oxigén, vezetőképesség).

Reprezentatív törzsek gyűjtéséhez a vegetációs időszak három évszakában (nyár: 1994. július 13., őszi: 1994. szeptember 20. és tavasz: 1995. április 6.), molekuláris vizsgálatok céljaira 1996. november 8-án, 1999. június 15-én és 2000. szeptember 13-án vettünk győ-



14. ábra. Természetes környezeti és szennyvíztisztító mintavételi helyeink.

kérmintákat. A kiválogatott, ép, élő gyökérdarabok csúcsának utolsó 5 cm-ét levágtuk (15. ábra), majd steril vízben hatszor mostuk, így a növények gyökeréhez gyengén kötődő rizoszféra frakciót eltávolítottuk. Ezután steril körülmények között (a molekuláris vizsgálatok esetében jégen) dörzsmozsárban homogenizáltuk a gyökereket. A homogenizátum (rizoplán + endorizoszféra) szolgált további elemzések tárgyául.



15. ábra. A gyékény 1-2 mm vastag "hajszálgökerei" egy a rizómából kiágazó főbb gyökéren (Halbritter András felvétele).

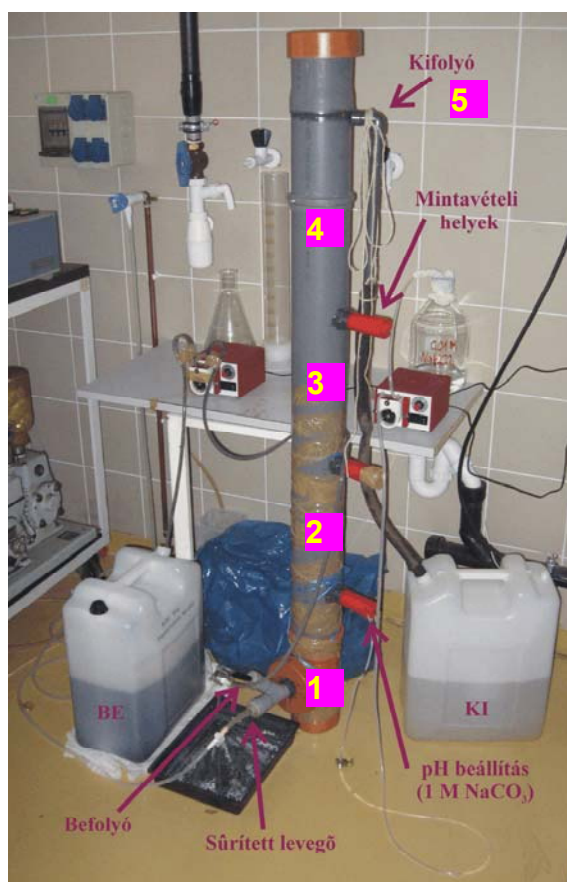
IV.1.3. Mintavételek a Fővárosi Csatornázási Művek Dél-pesti Szennyvíztisztító Telepén

A Fővárosi Csatornázási Művek Zrt. Dél-Pesti Szennyvíztisztító Telepén a mezofil és termofil üzemi iszaprothasztókkal párhuzamosan működtetnek egy három reaktorból álló kísérleti rendszert is. Mintáink a centrifugálással sűrített kevert szennyvíziszappal táplált kísérleti T2 (mezofil) és T4 (termofil) biogáz reaktorokból származnak. Térfogatuk sorrendben 1,5, és 3,5 m³. A reaktorok minden esetben 12,5 napos tartózkodási idővel működtek, vagyis a kísérleti rothasztók teljes térfogatának megfelelő szennyvíziszapot napi kétszeri rátáplálással, egyenletesen elosztva ennyi idő alatt szivattyúzták a rendszerbe. A reaktorok működését folyamatosan végzett fizikai-kémiai mérésekkel ellenőrzik. Ezek: hőmérséklet, pH, elektród (redox) potenciál, illósav és ammónia koncentráció, lúgosság, gáztermelés és a termelt gáz metántartalma. Mintavételt a mikrobaközösségek nemtenyésztéses módszerekkel (közösségi nukleinsav és lipid alapú vizsgálatok) történő elemzésére, a mezofil és a termofil reaktorokból 2005. augusztus 23-án, 31-én, szeptember 15-én és 20-án, 2005. november 21-én végeztünk, majd 2006. május 25-től július 6-ig egy felfűtéses kísérlet során (a hőmérsékletet 35 °C-ról indulva 4 °C-oként emelték az alábbi időpontokban: május 25. és 29., június 1., 8., 19., 22., 26., 29., július 3. és 6.) minden nap, a gáztermelés leállásáig. A nukleinsav kivonáshoz a mintát steril, 250 mL-es üvegekbe, a fermentor mintavételi csapjának alapos kifolytatása után vettük ügyelve az anaerób viszonyok fenntartására. Az üvegeket "mintahőfokon" szállítottuk a laboratóriumba (30 perc a feldolgozásig). Itt minden mintát anaerób körülmények között homogenizáltunk, majd ötször 1 - 1 mL-nyi iszapot pipettáztuk 2 mL-es csavarkupakos Eppendorf csövekbe. A mintákat centrifugáltuk (12 000 g, 10 perc), majd a felülúszót elöntöttük, a pelletet pedig fagyasztottuk és feldolgozásig -20 °C-on tároltuk. A közösségi lipid elemzésekhez a rothasztók mintavételi csapjának bő átfolytatását követően megközelítően 20 g tömegű iszapot zsírtalanított, jól zárható üvegedényben előzőleg összemért diklór-metán : metanol (1 : 2) elegybe engedtünk (Blight és Dyer, 1959), majd jégben hűtve a laboratóriumba szállítottuk mintáinkat. Ott tömegüket pontosan visszamértük. Tárolásuk -20 °C-on történt, maximum 5 napig. A minták szárazanyag tartalmát a további feldolgozás alkalmával határoztuk meg. Minden esetben két párhuzamos mintát vettünk.

IV.1.4. Nagy NH₃ terhelésű nitrifikáló szennyvíztisztító modell rendszer

2007. április elején a rothasztott iszap sűrítés nagy ammónia terhelésű csurgaléklevének nitrifikációs kezelésére kísérleti töltött oszlop reaktort állítottunk össze a Mikrobiológiai Tanszéken (16. ábra). Az üzembe helyezésre április 10-én került sor, a rend-

szert azóta megszakítás nélkül működik. Az oszlopba 1 m magasságban 7,5 kg mosott mordenit biofilm hordozót töltöttünk. A töltet alá 0,8 kg mosott 5 - 7 mm-es kavicsot rétegeztünk, így biztosítva a levegőztetés egyenletességét, valamint azt, hogy a töltet kisebb szemcséi ne jussanak át a tartórács hézagain. A töltött oszlop szabad térfogata az alsó holtterrel együtt kb. 5,8 L, levegőztetés mellett mintegy 4,7 L. A befolyó szennyvíz folyamatos ráta-áplálása perisztaltikus pumpával, átlagosan $0,23 \text{ L h}^{-1}$ sebességgel történik. A tartózkodási idő 20 h. Az oszlop oxigénellátását sűrített levegő bevezetésével biztosítjuk, fenntartva a 95 - 100 %-os oxigén-telítettségi állapotot. Rendszeresen mintázzuk a rendszerbe befolyó szennyvizet, és az onnan kifolyó, biológiai tisztításon már átesett vizet. Havonta réteges biofilm mintavételre is sor kerül, ez az oszlop oldalán lévő mintavevő nyílásokból lehetséges. A rendszer működésének nyomon követéséhez a következő kémiai paramétereket vizsgáljuk rendszeresen: hőmérséklet, oldott oxigén, oxigén telítettség, pH, NH_4^+ -, NO_2^- - és NO_3^- ion koncentráció, kémiai oxigénigény, szerves széntartalom (IC), összes széntartalom (TC) és összes nitrogén tartalom (TN).



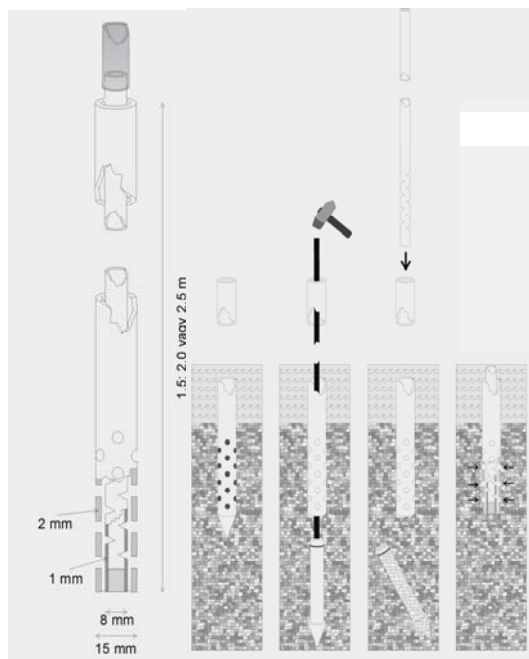
16. ábra. A laboratóriumi kísérleti nitrifikációs rendszer működés közben. 1 - 5: a mintavételi helyek sorszáma.

Az aktív, szervesanyag-eltávolításra és nitrifikációra képes biofilm kialakulásakor a pH - a befolyó vízre jellemző és a nitrifikáció számára optimális 7,5 körüli értékhez képest - jelentősen eltolódott savas irányba. A kifolyó víz pH-ja 4 - 5 közé csökkent, ami intenzív nitrifikációra enged következtetni. Az IC-mérések továbbá rávilágítottak arra, hogy a rendszer szerves szén-hiányos állapotban van. Emiatt pH mérés alapján szabályozva 1 M NaHCO_3 oldat (szakaszos) adagolását kezdtük meg a rendszer legalsó mintavételi helyén keresztül (mivel a mérések szerint a pH már ebben a zónában eltolódott). Az ammónia terhelés növelését előüleptített szennyvíz és rothasztott iszap csurgaléklé megfelelő arányú keverésével érjük el.

IV.1.5. Mintavétel a Fővárosi Vízművek északi vízbázisán

A parti szűrés alapját jelentő „kavicságy” biofilmjének hosszabb idejű aszályos periódust követő áradás esetén történő regenerálódására vonatkozó terepi kísérleteink helyszíne a Duna bal partján az 1662.2 fkm-nél található partszakasz (GPS földrajzi koordináták: északi szélesség 47,62560, keleti hosszúság 19,10891). A kis, vagy közepes vízállásnál előbukkanó mintegy 1 - 1,5 % lejtésű nagyon széles part hatalmas beszűrődési felületet képez. A kavicsréteg vastagsága mintegy 8 m. A Duna $600 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ vízhozam melletti vízállásához viszonyítva 4 - 7,5 m vastagságú a vízvezető réteg. Áteresztőképessége kedvező, egy-egy kút 100 - 150 m medersávról nyer vizet.

Az ismétlődő vízminta vételekhez a Duna mederben, valamint egy, az áradást modellező kísérleti medencében elhelyezett speciális, rozsdamentes acélból készült, szűrőzött műanyag béléscsővel ellátott mintavételi kutakat alkalmaztunk (17. ábra). Mindkét mintavételi helyszínen 4 mélységből vettünk vízmintát 4 - 4 figyelőkút alkalmazásával. Az alkalmazott kutak talpmélységei: 10 cm, 40 cm, 70 cm, 100 cm. Szűrőzve minden mélységben 10 cm volt, ezáltal a vizsgált szelvénymélységek: 0 - 10 cm, 30 - 40 cm, 60 - 70 cm, 90 - 100 cm a medence, vagy a meder fenéktől számítva. A kutak egymástól 65 cm-re, É - D irányban helyezkedtek el.



17. ábra. Dunai mintavételi kútjaink felépítése, valamint telepítése.

A friss elárasztást modellező kísérleti medencét a kavicssterasz parti szélén helyeztük el. A 4 m x 2 m x 1,05 m (sz x ma x mé) medence 1 cm vastag polikarbonát lemezekből készült és 0,4 m mélyen süllyesztettük be a kavicságyba. A modell medence 50 ± 5 cm vízmélységét vízszintszabályzóval üzemeltetett, a Dunában (a dunai kutak mélységében) elhelyezett búvárszivattyú biztosította.

Vízmintákat a szűrőzött béléscsőre rögzített szilikon csővel, és perisztaltikus pumpa felhasználásával vettünk $0,5 \text{ L h}^{-1}$ átfolyási sebességgel. Minden kútból minden lehetséges alkalommal 5 x 100 mL vízmintát nyertünk. A mintavételek előtt a kutak víztérfogatának háromszorosát kiszivattyúztuk! A kavicságy vizsgálatához fúrásos magmintavételt alkalmaztunk. A magmintát szintén két területen (meder, medence) négy mélységben (0 - 10 cm, 30 - 40 cm, 60 - 70 cm, 90 - 100 cm a medence, vagy a meder fenekétől számítva) vettünk.

1,5 L-es steril bő szájú edényekbe kb. 0,8 kg kavics mintát tettünk, négy-négy ismétlésben. Párhuzamosan a partszakaszhoz tartozó II/13 csáposkút nyers vizéből, a Duna felszíni vizéből és a telepítés időpontjában felszíni száraz és Duna-vízzel érintkező mederalj kavics mintákat is vettünk. A mintákat hűtve szállítottuk a laboratóriumba és 10 °C-on tároltuk a legkésőbb 8 órán belüli feldolgozásig. A mintavételi időpontokat és mintákat a 8. táblázatban soroljuk fel. A kísérleti időszak vízállás adatait a 18. ábrán mutatjuk be.

IV.1.6. Mintavétel a demjéni mesterséges "pangó vizes" szennyvíztisztítón

Környezeti mintáinkat a Korona Gombacsíra Üzem (Demjén) mesterséges "pangó vizes" típusú ipari szennyvíztisztítójának gyékényes (*Typha latifolia*) és nádas (*Phragmites australis*) ágyaiból vettük 2003. májusában. Földrajzi koordináták: északi szélesség 47°50'16''; keleti hosszúság: 20°19'54''. A rendszert az ELTE Mikrobiológiai Tanszéken készült technológiai tervek alapján 2001. óta folyamatosan üzemeltetik nagy KOI és szulfát tartalmú (gabona főzölé) szennyvíz tisztítására. A medencék ráfolyó és elfolyó régióiban 20 x 20 x 30 cm-es „növényágy” blokkokat vágunk ki és a megfelelő "saját vizében" a laboratóriumba szállítottuk. A laboratóriumban fiatal, frissen hajtott 0,5 - 2 mm vastagságú gyökérdarabok csúcsi részét vágjuk le, max. 5 cm hosszban. Steril desztillált vízben 6 x mosást végeztünk, a rizoszféra frakciót a 6. mosóvíz centrifugálásával nyertük (12 000 g, 10 perc), míg a mosott gyökérszövetet jégen aszeptikus körülmények között, mozsárban megőröltük. Ez a rizoplán - endorizoszféra frakciót képviselte (Nikolausz és mtsai, 2004). A mintavétellel párhuzamosan a helyszínen meghatároztuk az alapvető vízfizikai és kémiai paramétereket (hőmérséklet, pH, elektród (redox) potenciál, oldott oxigén, vezetőképesség).

IV.1.7. Mintavétel a kiskunsági szikes tavakból

Mintáinkat a Kiskunsági Nemzeti Park területén található Kelemen szék (földrajzi koordináták: északi szélesség 46°47' és keleti hosszúság 19°11') és Böddi szék (földrajzi koordináták: északi szélesség 46°45', keleti hosszúság 19°09') fenékküledékéből 5 cm belső átmérőjű poliakril csövek segítségével szúrással vettük (2003. május 8.). A csöveket 10 °C hőmérsékleten szállítottuk a laboratóriumba, ahol aszeptikus körülmények között az üledék hengereket a csövekből kicsúszattuk. Az üledék legfelső 3 - 4 cm-es rétegéből almintát vettünk, amelyekből hígítási sorozatot készítettünk és megfelelő táptalajokon szélesztettünk. A mintavétellel párhuzamosan a helyszínen meghatároztuk az alapvető vízfizikai és kémiai paramétereket (hőmérséklet, pH, elektród (redox) potenciál, oldott oxigén, vezetőképesség).

IV.2. Fizikai-kémiai változók mérése a laboratóriumban

A helyszíni mérésekhez hasonlóan a laboratóriumi fizikai-kémiai méréseket is az érvényes magyar szabványok szerint végeztük. A laboratóriumban mért paraméterek a következők voltak: hőmérséklet, pH, fajlagos elektromos vezetőképesség, zavarosság, szín, összes keménység, lúgosság (változó keménység), oldott oxigén, oxigén telítettség, szabad CO₂, reaktív PO₄³⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, SO₄²⁻, SO₃²⁻, S₂⁻, Cl⁻ ion tartalom, összes szerves szén (IC), összes szén (TC), összes nitrogén (TN), kémiai oxigénigény (KOI), klorofill-a. Több paraméter vonatkozásában nincs érvényes szabvány, vagy a mérést egyáltalában nem szabályozzák. Ilyenkor az amerikai „Standard Methods” utasításait követtük, ill. az EPA szabványokat alkalmaztuk (Eaton és mtsai, 1995). A vizek klorofill-a tartalom meghatározásánál figyelembe vettük Párist és mtsai (2002) ajánlását is (MSZ ISO 10260). Az elvégzett mérések egy csekély hányadában - ahol nem állt rendelkezésre szabványosított módszer - a szakirodalomban legtöbbször alkalmazott és megítélésünk szerint megbízható eljárást adaptáltuk. A vizsgálatok során az ivóvíz minősítő 201/2001. sz. Kormányrendelet előírásait, a felszíni vizekre vonatkozó MSZ 12749, valamint MSZ 12750 sz. szabványsorozatok, az üledékvizsgálatokhoz az MSZ 12739, a szennyvíz- és a szennyvíziszap vizsgálatában az MSZ 260, MSZ 22902,

MSZ 318, és MSZ 1484 sz. szabványsorozatok megfelelő szabványait alkalmaztuk. A vízminták esetén a paraméterek többségének vizsgálatához - az oldatfázis jellemzése céljából - szűrletet is készítettünk. A szűrés vákuum segítségével 0,45 µm pórusátmérőjű, speciális üvegszál membránnal (Schleicher és Schüll, Dassel, Németország) történt.

Vízmin-ták							
Időpontok	07.10.15.	07.10.24.	07.10.30.	07.11.7.	07.11.12.	07.11.21.	07.11.26.
Sorszám	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Kút	13kút	13kút	13kút	13kút	13kút	13kút	13kút
	*	KV10	KV10	KV10	KV10	****	KV10
	*	KV40	KV40	KV40	KV40	****	KV40
Medence	*	*	*	*	*	*	KV70
	*	*	*	KV100	KV100	KV100	KV100
	DF						DF
	DV10	DV10	DV10	DV10	**	**	**
Duna	DV40	DV40	DV40	DV40	**	**	**
	DV70	DV70	DV70	DV70	**	**	**
	DV100	DV100	DV100	DV100	**	**	**
Magminták							
Időpontok	07.10.15	07.10.24.	07.10.30.	07.11.7.	07.11.12.	07.11.21.	07.11.26.
Sorszám	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Medence	KK10	KK10	—	KK10	—	—	-
	KK40	—	—	KK40	—	—	-
	KK70	—	—	KK70	—	—	-
	KK100	—	—	KK100	—	—	-
Duna	DK10	—	—	DK10	—	—	DK10***
	DK40	—	—	DK40	—	—	DK40***
	DK70	—	—	DK70	—	—	DK70***
	DK100	—	—	DK100	—	—	DK100***

*a kút nem adott vizet

**magas vízállás miatt a mintavétel meghiúsult

***a mintavétel az árvíz miatt nem a dunai kutak térségében, hanem kijebb, de három hete elárasztott partszakaszon volt

****annak ellenére nem tudtunk vízmintát nyerni, hogy a Duna vízállása már a medence 0 szintjét meghaladta - nem volt mintavétel

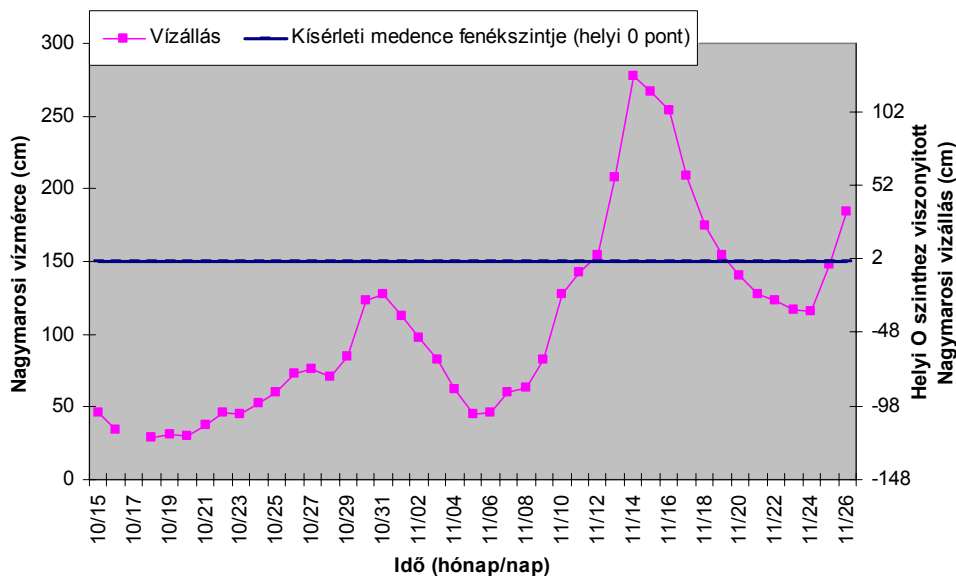
A minták jelölése: a medencéből származó vízminták jele KV, a Duna mederből vett vízminták jele DV, ez kiegészül a kút talpmélységével (10, 40, 70, ill. 100 cm). A medencéből származó magminták jele: KK, a Dunai magminták jele DK, ez kiegészül a legnagyobb mintavételi mélységgel (10, 40, 70, ill. 100 cm). Valamennyi mintajel része a mintavétel dátuma és/vagy sorszáma (pl. KV70-2007.11.26., vagy KV70-7). 13kút: a II 6 13 csáposkút vize. A Dunából merített felszíni vízminták jelzése DF. Felszíni száraz kavicsminta: KF, valamint kavicsminta a Duna-vízzel érintkező mederaljából: DM.

8. táblázat. Dunai mintavételeink időpontjai és a nyert minták.

IV.3. Tenyésztésen alapuló mikrobiológiai vizsgálatok

A tenyésztéses vizsgálatokban alkalmazott táptalajokat analitikai, valamint mikrobiológiai célra szolgáló (Merck, Darmstadt, Németország; Sigma-Aldrich, St. Luis, USA; Oxoid, Cambridge, Nagy Britannia; Difco, B&D, Franklin Lakes, USA) vegyszerekből készítettük a megfelelő előírások szerint és a sterilizálást - a külön említett kivételekkel - rutinszerűen autoklávban, telített gőzben 121 °C-on 20 percig végeztük. A tápközeg pH-ját általában 6,8 - 7,2 közötti értékre állítottuk be (a kivételeket a megfelelő helyen említjük).

Minden teszt két ismételtsben történt, oltásra a 24 órás szilárd, vagy leves tenyészetek egy kacsnyi mennyiségét alkalmaztuk. A szén-, nitrogén forrás értékesítési tesztekben a 24 órás agar tenyészetek kacsnyi mennyiségéből fiziológiás sóoldatban készítettünk szuszpenziót és annak kacsnyi mennyiségével inokuláltunk. A jellemző inkubálási hőmérséklet 28 °C volt, az eltéréseket a megfelelő helyen feltüntettük.



18. ábra. A Duna vízállása a terepi kísérlet során. A kísérleti medence fenéke a nagymarosi vízmerce 150 cm-es szintjével esik egybe (lásd jobboldali skála). A Dunába helyezett kutakat a nagymarosi 0 szint alatt helyeztük el (kb. -50 cm).

IV.3.1. Csíraszámbecslési eljárások

IV.3.1.1. Határhígítási módszerek (MPN - most probable number)

A higiénés bakteriológiai jellemzők (összcsíraszám, kóliszám, *E. coli* szám, *Enterococcus* szám, ammónia-oxidáló szám, denitrifikáló szám, ammonifikáló szám, *Clostridium*-szám) meghatározását az érvényben levő magyar szabványok szerint végeztük (MSZ EN ISO 26461-2; MSZ EN ISO 6222; MSZ 21470-77). A peptonból kénhidrogént képző baktériumok kimutatása Gorzó és mtsai (1998) szerint történt. A szulfátredukáló baktériumok (SRB) csíraszámának becslésére Fauque (1995) módszerét alkalmaztuk a Postgate's Medium B táplevessel.

IV.3.1.2. Szélesztéses módszerek

Mintáinkból hígítási sorozatot készítettünk és a különböző hígítások 0,1 mL mennyiségeivel tápagarlemezeket fertőztünk. A gyékény gyökérminták esetében "Módosított B-táptalajt" használtunk, felerészt az eredeti recept szerint, felerészt pedig 50 %-ban tözegkivonattal dúsítva (Kovács, 2002). A szikes tavak fenéküledékéből módosított tengervíz agaron szélesztettünk (DSMZ 246; <http://www.dsmz.de>; 10,0 g húskivonat, 10,0 g pepton; 20,0 g agar, 250 mL csapvíz, 750 mL mesterséges tengervíz; mesterséges tengervíz: 23,60 g NaCl, 0,64 g KCl, 4,53 g MgCl₂ x 6 H₂O, 5,94 g MgSO₄ x 7 H₂O, 1,30 g CaCl₂ x 2H₂O, 1,0 L desztillált víz; pH 9.0).

A táptalajok felületén 72 órától 6 napig 28 °C-on történt inkubálás során kifejlődött különálló telepeket válogatás nélkül nagy számban izoláltuk a szélesztéshez használt tápközzel megegyező összetételű ferde agarra. Izolátumainkat azonosításra alkalmas (törzs)számjelzéssel láttuk el. Az izolálásokkal egy időben telepszámlálást is végeztünk és megállapítottuk az egységnyi mennyiségű vizsgált közegek csíraszámát (TKE) is.

IV.3.2. Tisztítás, törzsfenntartás, autentikus (típus) törzsek

Az izolátumok tisztítása az izoláló táptalajon történt újrászélesztés és újraizolálás módszerével. Törzseinket az izoláló tápközegen tartottuk fenn 3 havi átoltással, közben a ki-nőtt tenyészeteket 5 °C-os hűtőszekrényben tároltuk. Törzseinket ezzel párhuzamosan kerá-miagyöngyös fagyasztófiolákban (Protect, TSC, Heywood, Nagy-Britannia) a gyártó előírá-sainak megfelelően fagyasztottuk és -90 °C-on törzsgyűjteményben tároljuk.

Az összehasonlító elemzésekhez szükséges autentikus (típus) törzseket a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (Braunschweig, Németország) gyűjteményből szereztük be.

IV.3.3. Telep- és sejtmorfológiai, valamint mikromorfológiai vizsgálatok

A telepmorfológiai megfigyeléseket preparáló mikroszkóp alatt, az izoláló tápagaron nőtt tenyészeteken végeztük. A sejtmorfológiát (sejtalak, sejtméret és elrendeződés) Gram festett preparátumokban határoztuk meg (Claus, 1992). Fáziskontraszt megvilágítással 100 x-os objektívvel is tanulmányoztuk a tenyészetek natív preparátumait. Az endospóra fes-tést Murray és mtsai (1994) módszerével végeztük. A méreteket hitelesített okulár-mikromé-terrel vettük fel. A mozgásképességet 12 és 24 órás levestenyészetekből készített függőcsepp preparátumokban ellenőriztük. Ezen túl mind az endospóra morfológiát, mind pedig a csillók meglétét a fenntartó táptalajon 24 óráig tenyésztett sejtek elektronmikroszkópi vizsgálatával is ellenőriztük Borsodi és mtsai (2003) eljárása szerint.

IV.3.4. A törzsek biokémiai - élettani jellemzése

Az élettani és biokémiai tesztek közül a kataláz és Kovács féle oxidáz aktivitás, d-glukóz oxidációs és fermentációs bontása (Hugh és Leifson féle), sav és gázképzés glukóz-ból, metil-vörös és Voges-Proskauer próba (Barritt féle), nitrát redukciója nitritté, ill. N₂ gázzá, foszfátáz aktivitás (Baird-Parker szerint), H₂S termelése ciszteinből, indolképzés triptofánból, eszculin hidrolízis, tirozin lebontás, fenilalanin dezamináz, citrát hasznosítás (Simmons szerint), NH₄⁺ ion használata egyedüli N forrásként elemzését Barrow és Feltham (2003) leírása alapján végeztük. Smibert és Krieg (1994) eljárását alkalmaztuk az úreáz teszt, kazein, zselatin, keményítő és Tween 80 hidrolízis vizsgálata esetében. Az anaerób körülmé-nyek között való növekedés képességét Forma Scientific anaerób rendszerben 7 napos 28 °C-on, a fenntartó táptalajon történt tenyésztéssel ellenőriztük. A növekedéshez kedvező kémha-tás tartományt húspepton táplevesben (3,0 g húskivonat, 5,0 g pepton, [szikes közegből izolált törzseknél 50,0 g NaCl] 1.0 L desztillált víz) határoztuk meg 5,7-es pH-n, ill. 7.0 - 12.0 pH között (0,5 pH egységenként, pH beállítás 1 M KOH, ill. 1 M HCl oldat segítségével). A nö-vekedéshez szükséges NaCl koncentrációját 0 - 20 % (m / v) értékek között (1 %-onként) 7,0, ill. a szikes közegből izolált törzsek esetében 9.0 pH értékre beállított húspepton levesben vizsgáltuk. Az optimális növekedési-szaporodási hőmérsékletet a fenntartó táptalajon hatá-roztuk meg 4 és 48 °C közötti hőfokokon (1 °C ugrásokkal). (A táptalajokat a szikes közegből izolált törzsek esetében mesterséges tengervízzel készítettük, amelynek a NaCl tartalmát 5 %-ra egészítettük ki.)

A Biolog szénforrás hasznosítási tesztekhez törzseinket BUGM (Biolog universal growth medium) tápközegen szaporítottuk (a szikes közegből izolált törzsek esetében BUGM kiegészítve 1 % glukózzal és 5 % NaCl-dal, pH 9,0). 16 órás 28 °C-on történt inkubációt kö-vetően 0,9 %-os (m/v) NaCl oldatban a BIOLOG GN, GP, valamint "Gram-pozitív spóra-képző baktérium" turbiditási standardokkal szuszpenziót készítettünk. A spóráképzést (ne le-gyenek spórák) mikroszkóposan ellenőriztük, majd beoltottuk a lemezeket. A szubsztrát hasz-nosítását jelző bíbor szín képződését 28 °C-on történt 24 és 48 órai inkubáció után 590 nm-en abszorpcióméréssel ellenőriztük. A szénforrás hasznosítást pozitívnak értékeltük, ha az adott

szénforráson mért abszorbanca értéke nagyobb volt, mint a lemezen mért átlag hasonlósági érték (a 96 lyukban mért abszorbanciák számtani átlaga).

IV.3.5. A törzsek kemotaxonómiai karakterizálása

IV.3.5.1. *Sejtfaljellemzők elemzése*

A törzsek sejtfalának jellemző diaminosavát teljes sejt hidrolizátumból Hasegawa és mtsai (1983) eljárásával határoztuk meg.

IV.3.5.2. *Kinon mintázat elemzés*

Az izoprenoid kinonokat Collins és mtsai (1977) módszerével vontuk ki és a kinon profil elemzést Groth és mtsai (1997) technikáját alkalmazva HPLC-vel (HP 9001) segítségével végeztük. A sejteket (a szikes közegből izolált törzsek esetében 50,0 g NaCl-dal kiegészített és 9.0 pH-ra állított) folyékony „Rich tápközegben” (Yamada és Komagata, 1972) tenyésztettük.

IV.3.5.3. *Zsírsavelemzés*

A zsírsavelemzést (a szikes közegből izolált törzsek esetében 50,0 g NaCl-dal kiegészített és 9.0 pH-ra beállított) „Tryptic Soy” agar tápközegen 24 óráig szaporított sejttömegből végeztük Stead és mtsai (1992) kivonási és Groth és mtsai (1996) gázkromatográfiás elemzési ajánlásai szerint. A poláris lipid analíziseket Minnikin és mtsai (1979) módszere alapján készítettük.

IV.3.5.4. *G + C molarány meghatározása és DNS - DNS hibridizáció*

A genomi DNS bázisarányának meghatározásához, valamint a teljes sejt DNS - DNS hibridizációs vizsgálatokhoz a törzseket a fenntartó táptalajon tenyésztettük. A DNS-t franciaprés (Thermo Spectronic, Rochester, USA) segítségével izoláltuk és Cashion és mtsai (1977) hidroxipatit oszlopkromatográfiás módszerével tisztítottuk. A DNS G + C arány elemzéshez a tisztított DNS-t P1 nukleázal, valamint szarvasmarha bélnyálkahártya eredetű alkalikus foszfátalázal nukleozidokra hasítottuk Mesbach és mtsai (1989) eljárásával. Az egyes nukleozidok mennyiségét reverz fázisú HPLC eljárással határoztuk meg (HP 9001) Tamaoka és Komagata (1984) módszerével. A DNS G + C tartalmát a deoxiguanozin - timin arányból számítottuk. A DNS - DNS hibridizációt De Ley és mtsai (1970) eljárása szerint 2 x SSC pufferban végeztük 67 °C hőmérsékleten. A mérések Huß és mtsai (1983) ajánlásainak figyelembevételével Cary 100 BIO UV/VIS (Varian, Palo Alto, USA) spektrofotométerrel történtek, amely fel volt szerelve Peltier elemes termosztálású 6 x 6 küvetaváltóval és in situ hőmérséklet ellenőrzéssel alapuló programozható hőmérséklet szabályozóval.

IV.3.5.5. *Törzsidentifikáció a polifázikus elv szem előtt tartásával*

Törzseinket a Bergey's Manual, ill. a Prokaryotes kézikönyv megfelelő szakaszainak fajleírásai és összehasonlító fenotipikai táblázatai alapján identifikáltuk és ellenőriztük a kemotaxonómiai bélyegek helytállóságát is (Garritty, 2001; Dworkin és mtsai, 2006; ill. ezek előző kiadásai). Felhasználtuk a Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt és mtsai, 1994) határozókulcsait. Ezen kívül törzseinket a Biolog automatikus identifikációs rendszer segítségével is azonosítottuk (Klieglér és mtsai, 1992), mindig a legújabb szoftver és adatbázis verzió használatával.

IV.3.6. 16S rDNS bázissorrend elemzés és az eredmény filogenetikai értékelése

IV.3.6.1. *DNS kivonása és tisztítása baktériumtörzsekből*

A 16S rDNS bázissorrend meghatározáshoz a tenyészetekből DNS-t a hagyományos fenol-kloroformos eljárással (Sambrook és mtsai, 1989), vagy Romsics és Márialigeti (2008)

KOH-os módszerével, vagy pedig Bacterial Genomic DNA Mini-prep kit (V-Gen Biotechnology Ltd., Hangzhou, Kína) segítségével vontuk ki. További felhasználásig a DNS-t desztillált vízben, vagy 2,5 mM Tris-HCl (pH 8,5) pufferben oldottuk fel és -20 °C-on tároltuk.

A DNS koncentrációját és tisztaságát - amikor szükséges volt - spektrofotométerrel ellenőriztük a 260, ill. a 280 nm-en mért abszorpció hányadosának meghatározásával (alapvonal korrekció 320 nm-en, Lambda 35 UV-VIS spektrofotométer, Perkin Elmer, Boston, USA).

IV.3.6.2. 16S rDNS konszenzus PCR

A 16S rDNS gént az 1. vagy 2. PCR eljárással (9. táblázat) szaporítottuk 50 µL végtérfogatban PE 2400 PCR System (Perkin-Elmer Cetus, Waltham, USA), Hybaid PCR Express (Thermo Electron, Middlesex, Nagy-Britannia), Gene Amp 2400 PCR System, vagy ABI 2700 PCR készüléken (Applied Biosystems, Foster City, USA) berendezésben. A PCR terméket Viogene PCR-M Clean Up kittel (Proteogenix, Illkirch, Franciaország) tisztítottuk a gyártó előírása szerint és 4 °C-on tároltuk további felhasználásig. A terméket 0,5 µg mL⁻¹ etidium-bromiddal festett 1 %-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 100 V, 15 perc futási paraméterekkel. Egy-egy kísérleti sorozatot mindig ugyanabban a PCR berendezésben és azonos reagensek, fogyóeszközök felhasználásával végeztünk.

IV.3.6.3. Bázissorrend elemzés és filospéciesz identifikáció

A szekvenáló reakcióhoz megtisztított PCR termékek DNS koncentrációját fotometriás eljárással meghatároztuk, molekuláris biológiai minőségű vízzel hígítottuk úgy, hogy a reakcióba 20 ng PCR terméket tudjunk bevinni 5 µL oldatban. A szekvenálást a Sanger féle láncterminációs eljárás alapján alapuló BigDye Terminator v 3.1 kittel végeztük (Applied Biosystems, Foster City, USA). Törzseinkből a gyakorlatilag teljes 16S rDNS bázissorrendet határoztuk meg a 3. módszerrel (9. táblázat). A ciklikus szekvenálás után a mintát tisztítani kell az elektroforézis előtt, hogy a fölösleges, beépületlen fluoreszcensen jelölt terminátor nukleotidokat eltávolítsuk. Ezt a tisztítási lépést Multi Screen® HTS HV centrifugálható, szűrős, mikrotiter-lemezek (Millipore, Billerica, USA) végeztük, amelyekbe elválasztó mátrixként Sephadex gélt töltöttünk (Sigma, Osterode, Németország). A szűrést Sigma 2-16K (SIGMA, Osterode, Németország) asztali centrifugán végeztük, mikrotiter feltéttel 1 000 g mellett, 5 percig. Így a termékeket az ABI mikrotiter lemezeibe (MicroAmp™, Applied Biosystems, Foster City, USA) szűrtük, amiket szűrés után az automata genetikai analizátorba helyeztünk elemzésre.

A szekvenálási terméket ABI Prism 310 Genetic Analyser, ill. ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) berendezéssel értékeltük. Az elektroforetogramokat a Sequencing Analysis 5.2. szoftverrel elemeztük. A kapott bázissorrendet összevetettük az eredeti elektroferogramokkal és ellenőriztük az egyes csúcsok valódiságát, a Sequence Scanner v. 1.0, és a Chromas Lite (Technelysium, Sydney, Ausztrália) szoftverekkel.

A bázissorrend adatok ellenőrzése és RNS kódra történő átfordítása (Chromas, Technelysium, Sydney, Ausztrália) után a filogenetikai feldolgozást részben az ARB programcsomag (Strunk és Ludwig, 1995), részben a MEGA v. 4 (Tamura és mtsai, 2007) szoftvercsomag segítségével végeztük. A bázissorrendet az RDP adatbázisba (Maidak és mtsai, 2001) illesztettük. Valamennyi bázissorrendet összehasonlítottuk a Gen Bank adatbázisban fellelhető 16S rDNS adatokkal is a BLAST keresőprogram használatával (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). A hasonlóságot mutató találatokat előzetes számítógépes illesztés után kézzel illesztettük az Alignment Editor ae2-ben, majd további részletes elemzésnek vetettük alá, és filogenetikai törzsfákat szerkesztettünk.

A Kimura féle kétparaméteres, valamint a Jukes és Kantor féle eljárásokkal is meghatároztuk az evolúciós távolságokat (Kimura, 1980; Jukes és Cantor, 1969). A (filogenetikai) törzsfákat több különböző algoritmus segítségével képeztük: neighbour-joining (Saitou és Nei, 1987), maximum likelihood (Felsenstein, 1981) és legkisebb négyzet (last squares; De Soete, 1983). A faszerkezetet bootstrap újramintázási eljárással ellenőriztük 1000 lépés alkalmazásával (Felsenstein, 1985).

A kiméra szekvenciák jelenlétét az RDP II. (Maidak és mtsai, 1999) interneten elérhető kiméra ellenőrző programjával (CHECK_CHIMERA) vizsgáltuk.

IV.4. Nemtenyésztéses mikrobiológiai vizsgáló módszerek

IV.4.1. Sejtszám és biomassza meghatározása

A planktonikus baktériumszám meghatározása az AODC (acridin orange direct count) eljárással Hobbie és mtsai (1977) módszere szerint történt. A felszíni és mélységi vízmintákból 5 - 5 mL-t, kútvízből 100 mL-t fixáltunk 2 %-os paraformaldehid oldattal. A kiértékelést és sejtszámolást ImageProPlus programcsomag segítségével végeztük el. Mivel a minták gyakran nem egyenletesen szűrődnek, minden mintából 14 - 20 látóteret vizsgáltunk és számoltunk. Ehhez először elkészítettük a látótér fényképét, negatív képpé konvertáltuk, végül a program segítségével leszámoltuk a sejteket. A biomasszát képelemző szoftver számította a sejtek hossz-átmérő adatai alapján. Az eredményekben az átlagokat használtuk.

IV.4.2. Közösségi ATP mennyiség mérése

A teljes mikrobiális közösség ATP-mennyiségét BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega, Madison, USA) kit alkalmazásával mértük. Ennek alapja, hogy a reagensben lévő luciferinnel a szintén jelenlévő luciferáz enzim fény kibocsátása (lumineszcencia) mellett reagál (Velten és mtsai, 2007). Mivel a reakció sztöchiometrikus mennyiségben igényel ATP-t, az emittált fény intenzitása a jelenlévő ATP mennyiségével arányos. A képződött fényt Fluoroskan Ascent FL luminométerrel (Thermo Scientific, Rochester, USA) mértük.

IV.4.3. Környezeti nukleinsav kivonáson alapuló eljárások

IV.4.3.1. DNS kivonás környezeti mintákból

A teljes közösségi DNS-t Fast DNA (Qbiogene, Carlsbad, USA) kit alkalmazásával nyertük ki mind a rizoszféra, mind a gyökérhomogenizátum esetében (a gyártó által előírt eljárást használtuk). A vízmintáknál 100 - 100 mL vízmintát szűrtünk le 0,22 µm pórusátmérőjű Millipore Express® membránon (Millipore, Billerica, USA). A DNS-t a "membránból" UltraClean™ Water DNA Isolation Kittel (MoBio, Carlsbad, USA) izoláltuk a gyártó által megadott leírás szerint. A dunai üledéknél 500 - 500 mg lehetőleg homogén mintából az UltraClean™ Soil DNA Isolation Kittel (MoBio, Carlsbad, USA) nyertük a DNS-t.

A nyert DNS-t desztillált vízben, vagy 2.5 mM Tris-HCl (pH 8,5) pufferben oldottuk fel és a továbbiakban -20 °C-on tároltuk. A DNS koncentrációját és tisztaságát - szükség esetén - a IV.3.6.1. pont szerint ellenőriztük (56. lap).

IV.4.3.2. RNS kivonás környezeti mintákból

Mivel a vizsgálataink elkezdésekor nem volt a szakirodalomban rizoplánból történő RNS izolálásra fellelhető eljárás, saját módszert dolgoztunk ki (Nikolausz és mtsai, 2004). A szennyvíziszap, szennyvíz minták esetében már a kereskedelemben kapható kitet alkalmaztunk: Total RNA Mini-prep kit (V-Gene Biotechnology, Hangzhou, Kína). Az RNS-t azonnal felhasználtuk, vagy rövidebb időre -80 °C-on tároltuk.

Eljárás száma	Primer név	Primer bázissorrend	Cél (szervezetek)	PCR profil	Hivatkozás
1. eljárás	27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria	98 °C, 5 perc; 35 ciklus (94 °C, 30 mp; 52 °C, 30 mp; 72 °C, 1 perc); 72 °C, 10 perc	Lane, 1991
	1492R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Univerzális		Polz és Cavanaugh, 1998
2. eljárás	27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria	98 °C, 5 perc; 35 ciklus (94 °C, 30 mp; 52 °C, 30 mp; 72 °C, 1 perc); 72 °C, 10 perc	Lane, 1991
	1525R	5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'			
3. eljárás	531R	5'-GWA TTA CCG CCG CGG CKG CTG-3'	Szekvenálás	25 ciklus (96 °C, 10 mp; 50 °C, 5 mp; 60 °C, 4 perc)	Lane és mtsai, 1985
	357F	5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3'			Lane, 1991
	1114F	5'-GCA ACA GCG CAA CCC-3'			Lane, 1991
	1492R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'			Polz és Cavanaugh, 1998
	338R	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'			Amann és mtsai, 1990a
	63F	5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'			Lane, 1991
	1387R	5'-CGG AAC ATG TGW GGC GGG-3'			Lane, 1991
4. eljárás	A109F	5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3',	Archaea	98 °C, 3 perc; 94 °C, 10 mp; 35 ciklus (52 °C, 30 mp; 72 °C, 1 perc; 94 °C, 30 mp); 72 °C, 20 perc	Whitehead és Cotta, 1999
	A934R	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3			

5. eljárás	TET* 5' 27F	TET 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria T-RFLP	96 °C, 3 perc; 32 ciklus (94 °C, 30 mp; 52 °C, 30 mp; 70 °C, 1 perc); 70 °C, 10 perc	Lane, 1991
	1387R	5'-CGG AAC ATG TGW GGC GGG-3'			
	TET 5' 63F	TET-5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'			
	1387R	5'-CGG AAC ATG TGW GGC GGG-3'			
6. eljárás	HEX** 5' 27F	HEX-5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'	Archaea T-RFLP	98 °C, 5 perc; 35 ciklus (94 °C, 30 mp; 52 °C 30 mp; 72 °C, 30 mp); 72 °C 10 perc	Muyser és mtsai, 1993
	519R	5' ATT ACC GGG GCT GGT 3'			
	HEX** 5' A344F	HEX 5'-ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA-3'			
	A934r	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'			
7. eljárás	63F***	5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'	Bacteria, DGGE-t megelőző PCR	95 °C, 3 perc; 32 ciklus (94 °C, 30 mp, 53 °C, 30 mp, 72 °C, 40 mp), 72 °C, 10 perc	Marchesi és mtsai, 1998 Amann és mtsai, 1990
	338R	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'			
8. eljárás	27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria, klónozást megelőző PCR, Taq	98 °C, 5 perc; 84 °C, 10 mp; 32 ciklus (94 °C, 30 mp; 52 °C, 30 mp; 72 °C, 1 perc); 72 °C, 30 perc	Lane, 1991
	1492R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'			
9. eljárás	27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria, klónozást megelőző PCR, Pfu	98 °C, 2 perc; 28 ciklus (52 °C, 1 perc; 72 °C, 3 perc; 93 °C, 1 perc); 72 °C, 10 perc	Lane, 1991
	1492R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'			

10. eljárás	27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria, klónozást megelőző PCR, Taq	96 °C, 3 perc; 35 ciklus (94 °C, 30 mp, 52 °C, 30 mp, 72 °C, 30 mp); 72 °C, 30 perc	Lane, 1991 Muyzer és mtsai, 1993
	518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'			
11. eljárás	M13F	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	Klónok PCR-ezése	96 °C, 2,5 perc; 32 ciklus (95 °C, 30 mp; 52 °C, 30 mp; 72 °C, 1 perc); 72 °C, 10 perc	Stratagene (La Jolla, USA)
	M13R	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'			
12. eljárás	AmoA F	5'-GGG AAT TCA GAA ATC CTG AA-3'	Ammónia oxidáló specifikus	98 °C, 5 perc; 35 ciklus (94 °C, 30 mp; 52 °C 30 mp; 72 °C, 30 mp); 72 °C 10 perc	Sinigalliano és mtsai, 1995
	AmoA R	5'-GGG GAT CCG ATA GGA ACG CAG AGA AG-3'			
13. eljárás	338F	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	<i>Nitrospira</i> specifikus	96 °C, 3 perc; 35 ciklus (94 °C, 30 mp, 52 °C, 30 mp, 72 °C, 30 mp); 72 °C, 30 perc	Amann és mtsai, 1990 Daims és mtsai, 2001
	Ntspa 662R	5'-GGA ATT CCG CGC TCC TCT-3'			
14. eljárás	338F	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	<i>Nitrobacter</i> specifikus	96 °C, 3 perc; 35 ciklus (94 °C, 30 mp, 52 °C, 30 mp, 72 °C, 30 mp); 72 °C, 30 perc	Amann és mtsai, 1990 Wagner és mtsai, 1996
	Nit 3R	5'-CCT GTG CTC CAT GCT CCG-3'			

Kevert bázisok kódjai: M = A + C, R = A + G, W = A + T, S = G + C, Y = C + T, V = A + G + C, H = A + C + T, D = A + G + T, B = G + T + C, N = A + G + C + T, K = G + T

*tetrakloro-fluoreszcein-foszforamidit

**hexakloro-fluoreszcein-foszforamidit

***egy 39 bp hosszúságú GC-kapcsot csatoltunk az 5' véghez (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA GGG GGG-3')

9. táblázat. Az alkalmazott PCR eljárások összegzése.

IV.4.3.3. Konszenzus PCR technikák

A növényi eredetű minták vizsgálatában az 1., 2., 4., 8 és 9. sz., míg a víz, szennyvíz szennyvíziszap, valamint dunai üledék mintáknál az 1., 2., és 5. sz. PCR technikákat alkalmaztuk, míg az Archaea vizsgálatokban a 4. sz., a nitrifikálók elemzésében pedig a 12., 13. és 14. eljárást használtuk (9. táblázat) 200 µL térfogatú csövekben 25 µL végtérfogatban Hybaid PCR Express (Thermo Electron, Middlesex, Nagy-Britannia), vagy Gene Amp 2400 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) berendezésben. A gradiens PCR alkalmazásoknál a hibridizációs hőmérsékletet 47 és 61 °C között változtattuk (Sipos és mtsai, 2007). Második, fészkes (nested) PCR, vagy DGGE-PCR, T-RFLP PCR esetekben a 2. és 7. eljárásokat használtuk (9. táblázat; Nikolausz és mtsai, 2005). A PCR termékeket Viogene PCR-M Clean Up System (Proteogenix, Illkirch, Franciaország) kittel tisztítottuk.

A PCR paraméterek közösség összetétel torzító vizsgálatával kapcsolatosan a ciklus-szám változtatás hatását elemző kísérletekben a 18, 24, 32, ill. 48. ciklust követően zártuk az 1. sz. reakciót (9. táblázat) 70 °C-on 10 percig tartó végső lánchosszabbítással. Minden PCR-t három ismétlésben végeztünk, ahol a templát DNS egymástól független keverésben készült. A PCR terméket etidium-bromid festés alkalmazásával 1 % agaróz gélben elektroforetizálva UV fény alatt ellenőriztük (Sambrook és mtsai, 1989).

IV.4.3.4. Reverz transzkripció

Az RNS mintáink PCR amplifikációja előtt szükség volt a rRNS cDNS-re fordítására reverz transzkripcióval. Mivel a reverz transzkripciót általában PCR követi, gyakran használják a reverz-transzkriptáz PCR (RT-PCR) kifejezést. A reverz transzkripciót a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilnius, Litvánia) segítségével hajtottuk végre random hexamer primerekkel:

- PCR csőben 2 µL RNS mintát 9 µL RN-áz mentes vízzel hígítottunk, majd 1 µL random hexamer primert ($0.2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) mértünk hozzá,
- a mintát 10 percig inkubáltuk 70 °C-n, ezalatt a rRNS-ek másodlagos szerkezete denaturálódik. A mintát hirtelen lehűtve, a denaturált állapot többé-kevésbé fennmarad.
- Jégen tartva a mintát, 5 µL 5 x reakció puffert, 1 µL ribonukleáz inhibitort ($20 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), és 2 µL dNTP keveréket mértünk hozzá, majd 5 percig inkubáltuk 25 °C-n (primer csatolás),
- 1 µL RevertAid M-MuLV reverz transzkriptáz ($200 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) hozzáadása után egy további annellációs (25 °C, 10 perc) lépést követően a reverz transzkripció 42 °C-n 60 percig tartott. A szintetizált cDNS-t tisztítás nélkül használtuk a 7. sz. PCR reakció (9. táblázat) templátjaként (Nikolausz és mtsai, 2004).

IV.4.3.5. DGGE

A PCR termék DGGE vizsgálatát a Muyzer és mtsai (1993) által közölt paraméterek szerint végeztük ProteanIIxi gélelektroforézis rendszerben (Bio-Rad, Hercules, USA). A 60 °C-os stabil futtatási hőmérsékletet a futtató puffer folyamatos átáramoltatásával, termosztát közbeiktatásával oldottuk meg. A PCR terméket 8 % (m / v) poliakrilamid gél zsebeibe töltöttük. A gélben 40 - 70 % denaturálószer gradienst biztosítottunk (7 M urea és 40 % formamid felel meg 100 %-os denaturáló koncentrációnak), egy-egy futás 1 x TAE pufferben 80 V feszültség alkalmazásával 14 h időtartamig tartott. Az elektroforézist követően a géleket etidium bromiddal festettük, desztillált vízben 2 x öblítettük, majd UV fényben elemeztük a gélképet. A DGGE mintázatokat Phoretix 1D gél elemző program segítségével értékeltük ki (v. 4.0, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Nagy-Britannia).

Amennyiben a csíkokhoz tartozó filospéciesz identifikálására volt szükség, ill. azokban az esetekben, ahol a csíkok közötti területet vizsgáltuk a gél darabokat külön-külön steril

szike segítségével vágtuk ki. A DNS-t 60 µL desztillált vizes, egy éjen át tartó áztatással eluáltuk. A PCR-amplifikációt a 7. sz. eljárással végeztük (9. táblázat).

IV.4.3.6. T-RFLP

A PCR-termékeket *AluI* (5'AG↓CT), *Hin6I* (5'G↓CG↑C), *TaqI* (5'T↓CG↑A), *BsuRI* (5'G↓GCC), *Eco47I* (5'G↓GA/TGC), *EcoRI* (5'G↓AATTC), *BamHI* (5'G↓GATCC) enzimekkel emésztettük, egy reakció során mindig csak az egyik enzimet alkalmazva (Sipos és mtsai, 2007). A terméket etanolos precipitációval tisztítottuk meg, végül a mintákat beszárítottuk. A T-RFLP-hez mintáinkat 12 µL deionizált formamid, 0,6 µL TAMRA belső standard (Applied Biosystems, Foster City, USA) és 0,5 - 1,5 µL restriktációs emésztési termékből elegyítettük, majd 5 percig 96 °C-on denaturáltuk és ezt követően rögtön jégbe tettük. A fluoreszcensen jelölt terminális fragmenseket (T-RF) ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) berendezésben kapilláris elektroforézissel választottuk el POP-4TM polimer közegben.

A kromatogramok elemzését a Genemapper v. 3.7 program (Applied Biosystems, Foster City, USA) segítségével végeztük. A környezeti minták T-RFLP profil elemzésében néhány módosítással Saikaly és mtsai (2005) eljárását követtük. Ennek értelmében a csúsmagasság helyett a profilokat a kumulált csúcs alatti terület (a primer csúcsokat kihagyva) felhasználásával standardizáltuk. Az egyes kromatogramokat T-Align programmal (<http://inismor.ucd.ie/~talign/>) illesztettük egymáshoz, majd csoport elemzés statisztikai módszer segítségével vizsgáltuk a minták hasonlóságát.

IV.4.3.7. A multitemplát PCR torzításának elemzésében alkalmazott eljárások

A vizsgálati modell rendszerünk validálására ismert mennyiségű PCR termékekből keverékeket készítettünk. A tisztított PCR termékekből 150 ng mennyiségeket elegyítettünk 1 : 1 arányban és 3 óra hosszat emésztettük 3 U restriktációs endonukleáz enzimmel 20 µL reakciótérfogóban (minden esetben három párhuzamosban). A restriktációs emésztéshez a *Hin6I* (5'G↓CG↑C), *MspI* (5'C↓CCG), *Csp6I* (5'G↓TAC), *BshI236I* (37 °C) és a *TasI* (5'T↓CG↑A)(65 °C) enzimeket (Fermentas, Vilnius, Litvánia) használtuk külön-külön reakciókban. A *TasI* enzimet csak 0,4 U koncentrációban alkalmaztuk az ún. „star activity” (Nasri és Thomas, 1987) elkerülésére. A multitemplát PCR termékek emésztésénél ugyanezeket a körülményeket használtuk (modell közösségek és környezeti minták). Az emésztési termék elektroforézisét megelőzően etanol precipitációval újabb tisztítást végeztünk (Sambrook és mtsai, 1989). A tisztított, centrifugált pelletet 10 °C hőmérsékleten tároltuk és a T-RFLP elemzést közvetlenül megelőzően 20 µL desztillált vízben szuszpendáltuk.

A csúcs alatti terület összértéke a hibridizáció hőmérsékletének változtatását vizsgáló kísérletekben 210 402 és 261 963 fluoreszcens egység, míg a ciklusszám hatását elemző munkánkban 54 965 és 75 217 fluoreszcens egység között változott. Az összfluoreszcencia intenzitást a 18 ciklusos minta legkisebb értékéhez optimáltuk.

IV.4.3.8. Klónozás és klónkönyvtárak létrehozása

A közösségi 16S rDNS PCR terméket legtöbbször *Taq* DNS polimerázzal készítettük, ami terminális transzferáz aktivitásának köszönhetően az amplikokat egy túlnyúló adenin nukleotiddal látja el, alkalmassá téve azokat ún. TA-klónozó vektorokba történő ligálásra (8. sz. eljárás; 9. táblázat). A PCR termékeket tisztítás után (PCR-M kit, Viogene, Proteogenix, Illkirch, Franciaország) vagy a TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA), vagy pedig a pGEM-T Vector System (Promega, Madison, USA) vektorba ligáltuk, *E. coli* JM109 sejtekbe transzformáltuk, és ampicillin tartalmú LB agarlemezekre szélesztettük.

Gyékeny rizoszféra, rizoplán elemzésekben többször alkalmaztuk a tompa végű klónozást. Ilyenkor a 9. sz. PCR reakciót (9. táblázat) Pfu polimerázzal (Stratagene, La Jolla,

USA) végeztük. Ez az enzim tökéletes tompa végű terméket állít elő, emellett hőstabilitása és átírási pontossága is jobb volt, mint a 2004. előtt hozzáférhető Taq polimerázoké. A pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, USA) kitet a gyártó előírásának megfelelően használtuk, a terméket Epicurian Coli XL1-blue MRF' Kan szuperkompetens sejtekbe transzformáltuk.

Esetenként 200 - 200 fehér (inzertet tartalmazó vektorral bíró) klónteletet pontoztunk át LB lemezekre (húspepton tápközeg), majd újabb 24 órás inkubálás után a telepekből a DNS-t 96 lyukú mikrotiter lemezen, 5 perces, 98 °C-os inkubálással tártuk fel. A hősokkal feltárt és centrifugálással ülepített sejtek durva lizátumának felülúszóját a 10. sz. PCR reakcióba vittük.

IV.4.3.9. ARDRA

Mivel egy fajból származó DNS több klónba is kerülhetett, szükség volt az azonos fragmenseket tartalmazó klónok megkülönböztetésére a drága és időigényes bázissorrend elemzés előtt. Ehhez a nyert DNS szakaszokat (PCR-termékeket) restriktációs endonukleázokkal (*Hin6I* [*HinP1I*] [5'G↓CG↑C], *BsuR1* [5' G↓GCC] enzimek egyikével) emésztettük, a kapott fragmentumokat 2 %-os agaróz gélen elektroforézissel elválasztottuk (1 x TBE pufferben, etidium-bromid festés, pUC Mix Marker 8™ Ladder, [Fermentas, Vilniusz, Litvánia]). Az így nyert mintázatok hasonlósága alapján csoportokba soroltuk a klónokat (19. ábra), minden egyes csoportból egy reprezentáns klónt kiválasztottunk és meghatároztuk a 16S rRNS gén DNS bázissorrendjét (Massol-Deya és mtsai, 1995).

IV.4.3.10. Bázissorrend elemzés és filospécies meghatározása

A szekvenálás kivitelezése, és az azt követő identifikáció menete megegyezik a IV.3.6. fejezetben leírtakkal (56. lap).

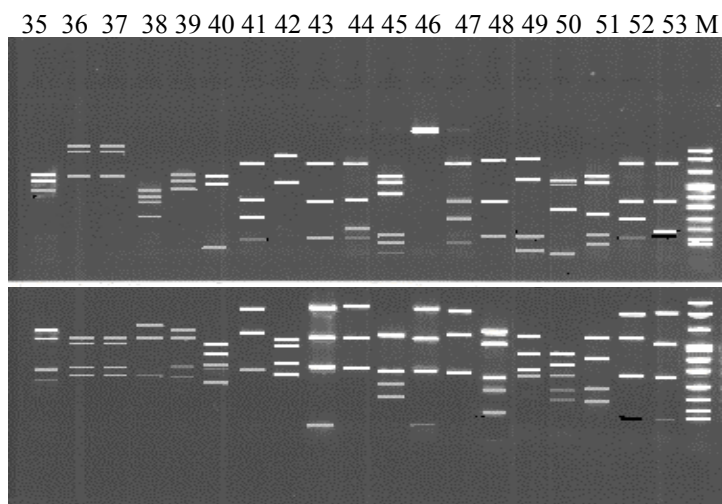
IV.4.4. Környezeti minták lipid kivonáson alapuló elemzési módszerei

Mintáink kezelése, tisztítása során csak zsírtalanított (tehát semmiféle kemotaxonómiai markert nem tartalmazó) eszközöket használtunk. Ahol lehetséges volt, hűtöttük, fénytől és oxigéntől távol tartottuk a vizsgált anyagot.

A zsíroldékony anyagok kioldásakor a diklór-metán : metanol keverékben tárolt fermentléhez 0.5 M foszfát puffert adtunk, és 6 órán át, hűtve kevertettük az elegyet. Ezt 10 perces ultrahangos kezelés, majd a diklór-metán elegyből való kiszorítása követte desztillált vízzel. Újabb 12 órás hűtést követően centrifugával választottuk szét a szilárd törmeléket tartalmazó, az apoláris (diklór-metán) és a poláris (metanol, víz, nem ülepedő törmelékek) fázisokat. A diklór-metán alkotta fázis tartalmazza a vizsgálni kívánt jelmolekulákat. Ezt a fázist leszívtuk, Whatman No.2. (Whatman, Dassel, Németország) szűrőpapíron átszűrtük és, vákuum alatt besűrítve (Rotadest 2118, Kutesz, Budapest) BB C18 oktadecil-szulfonát (Merck, Darmstadt, Németország) oszlopon tisztítottuk tovább. A nyers extraktumból előzőleg kis mennyiséget biomassza-beclsés céljára elkülönítettünk. Az oszlopra vitt extraktumból kloroform segítségével a kinonok, acetonnal a glikolipidek, metanollal pedig a foszfolipidek moshatók le (Tóth és mtsai, 2004).

IV.4.4.1. Foszfolipid foszfát alapú biomassza meghatározás

A biomassza meghatározását Findlay (1996), valamint Findlay és mtsai (1989) módszerével végeztük, amely a sejtek foszfolipid foszfát és szerves C tartalma közötti szoros összefüggésen alapul.



19. ábra. Jellegzetes ARDRA eredmény. A felső sor a *Tru9I*, az alsó a *HinPII* enzimmel történt emésztést mutatja. Ha a kétféle emésztésre kapott mintázat megegyezik (pl. 36 - 37, 43 - 53), akkor a két klón azonos.

IV.4.4.2. Kinon profil elemzés

A kinonokat vékonyréteg-kromatográfiás eljárással tisztítottuk tovább Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Németország) lemezeken. A vékonyréteg kromatográfia során a mena- és ubikinonok elválnak egymástól, ezért a következő HPLC elemzés során külön vizsgálhatók. A tisztítás után mintáinkat acetonitril : izopropanol 65 : 35 eluens használata mellett nagy felbontású folyadékkromatográfiával (HPLC) elemeztük (HP 9001 készülék, oszlop: ODS Spherisorb, Agilent, Santa Clara, USA). A komponenseket 270 nm-en, fényelnyelésük alapján detektáltuk. A kereskedelmi forgalomban standard kinon oldatok csak korlátozottan hozzáférhetők, ezért a pontos elemzéséhez a mintákkal egyidejűleg autentikus baktériumtörzsek kinonjainak preparálása szükséges. Ezek ismert kinon molekulái alapján történik a kromatogramok kiértékelése. A felhasznált baktériumtörzsek: *E. coli* (DSM 1116), *Pseudomonas fragi* (DSM 3456), *Bacillus sphaericus* (DSM 28), *Arthrobacter variabilis* (DSM 20132), *Brevibacterium linens* (DSM 20426), *Nocardioides simplex* (DSM 10368), *Micromonospora olivasterospora* (ATCC 21819) (Collins és mtsai, 1977).

IV.4.4.3. Zsírsav metilészter mintázat elemzése

A foszfolipidek zsírsav-komponenseit metil-észterekké való derivatizálásukat követően gázkromatográfiával (HP 5890 gázkromatográf, HP1 kapilláris-oszlop) választottuk szét. A zsírsavszármazékokat retenciós idejük alapján standard metil-észterekhez viszonyítva határozzuk meg (BAME [Sigma; Sigma-Aldrich, St. Luis, USA], Tóth és mtsai, 2004).

IV.5. Adatértékelési eljárások

A környezeti minták esetében tapasztalható közösségi szintű változások kimutatására a T-RFLP (és DGGE) mintázatok értékelésében a Shannon diverzitási indexet (H) alkalmaztuk, amelyet a következő módon számoltunk ki: $H = -\sum (p_i) (\log 2p_i)$, ahol i az egyes T-RF-eket jelenti, p_i az i fragmens relatív abundanciája (Shannon, 1948a, és b). Az abundanciát esetünkben a kérdéses fragmens csúcs alatti területe jelentette fluoreszcencia egységekben kifejezve. A kemotaxonómiai mintázatok esetében ennek analógiájára diverzitás (D) és egyenletesség (E) indexeket kalkuláltunk Hu és mtsai (1999) javaslata szerint. $D = [\sum (f_x^{1/2})]^2$, ahol f_x az x -ik molekulavariáns relatív gyakorisága a mintában, és $E = D/n$, ahol n a mintában fellelhető molekulaféleségek száma. D additív diverzitásindex, amely a gyakoriságbeli eloszlás ki-

egyenlítetttségével és a változók számával növekszik (maximális értéke n), míg E (equitability) egyedül a kiegyenlítetttségre érzékeny (maximális értéke 1).

A DGGE, T-RFLP, valamint a kemotaxonómiai mintázatok egyéb adatelemzésében a Microsoft Excel, az SPSS, a Statistica for Windows, valamint a Syntax 2000 (Podani, 2001) programcsomagok lehetőségeivel éltünk.

Az eredmények grafikus ábrázolásában több esetben a terjedelemmel standardizálás eljárását alkalmaztuk (Sokal és Rohlf, 1981). A vízoszlop stabilitás becslésére (RWCS - relative water column stability) Welsch módszerét használtuk, amely a vízsűrűségi adatok alapján számol (Padisák, 2005).

A filogenetikai eljárásokat a megfelelő pontokban ismertettük (IV.3.6.3., 57. lap).

V. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

V.1. A tenyésztés, csíraszámolásra alapuló eljárások használata és korlátai a (víz)mikrobiológiában

A mikrobiológia évszázados módszere a tenyésztésen, csíraszámoláson alapuló diverzitás vizsgálat. Lakonikus rövidséggel összefoglalva azt mondhatjuk: amennyiben a környezeti minta egységnyi mennyiségében sok mikroba található (nagy a csíraszám) ez egyúttal nagy mikrobiális aktivitásra is utal, s viszont, a kis csíraszám egyúttal csekély mikrobiális aktivitást jelent. Tudjuk, hogy e sommás megállapítás leginkább a könnyen hasznosítható szerves anyagokat nagy mennyiségben tartalmazó környezetek mintái esetében igaz, amint arra az irodalmi áttekintésben utaltunk a "great plate anomaly" kapcsán (8. lap)(pl. ember, állat, növény mikroba partnerei; eutróf vizek; talajok növényi maradványokban gazdag horizontjai). Meg kell jegyeznünk még azt is, hogy a csíraszám értéke csak megfelelően megválasztott tápközegek és (a mintára vonatkozóan) ideális tenyészfeltételek biztosítása esetén lehet informatív.

Minden ismert hibája ellenére a csíraszámolás módszere egyáltalában nem elvetendő. Mindenekelőtt is erre épül a higiénés mikrobiológia legnagyobb része, amikor az általa vizsgált közegek vonatkozásában összcsíraszámra és higiénés indikátor szervezetek csíraszám értékeire állapít meg határértékeket (fürdővíz, ivóvíz, élelmiszerek, sterilitási próba stb.) a legegyszerűbb esetben akár csak úgy, hogy a minta meghatározott térfogatában bizonyos mikroba nem lehet jelen. Az ivóvíz esetében az érvényes hazai (Európai Unió) előírások az összcsíraszám, kóliform szám, *E. coli* csíraszám, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* szám stb. adott víztérfogatra eső mennyiségével szabályozzák az alkalmasság kérdését. Az élelmiszerbiztonsági vizsgálatokban - annak típusától függően - *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria* stb. számokat is bevonnak, és nem csak a kórokozók kapcsolatos szempontokat érvényesítik, hanem a romlást okozó szervezeteket is tesztelik (pl. élesztőgombák, penészgombák csíraszám, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, vagy *Lactobacillus*, *Bacillus* spp. szám).

A környezeti mikrobiológia sok területén is a különböző mikroba élettani csoportok csíraszám értékeit elemezve értelmezzük a környezetállapot változás folyamatát. Így például a szennyvíztisztításban fontos lehet a N körforgalomban résztvevő mikrobák csíraszám becslése (nitrifikálók / denitrifikálók pl.), vagy a biológiai korrózió elemzésénél a „savtermelők” élettani csoportjának számláláson alapuló aktivitásbecslése, akár pedig a H₂S termelők csíraszám meghatározása. A csíraszám becslés eredményeinek értékelése legtöbbször csupán a párhuz-

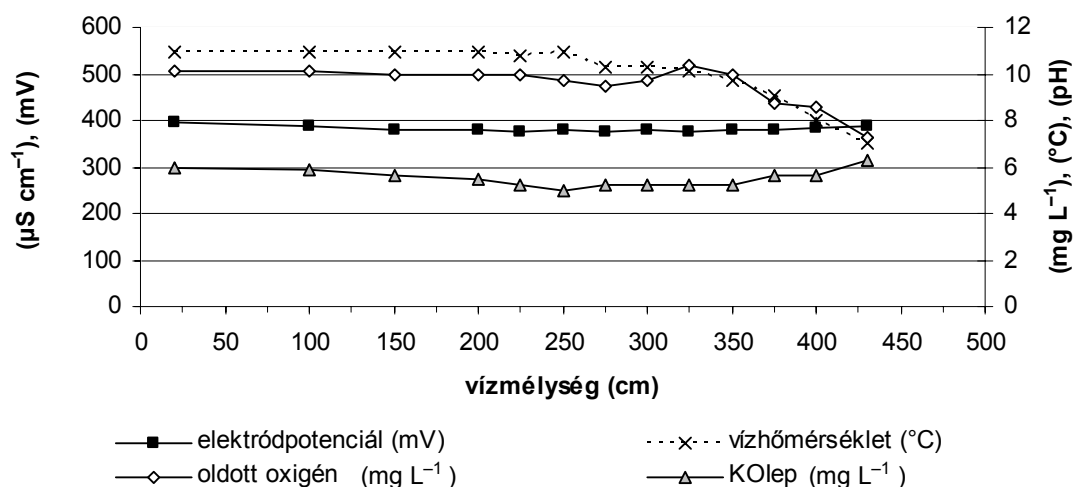
zamosan végzett kémiai elemzések adatainak figyelembe vételével történhet (és viszont). Vagyis a mikrobiológiai és fizikai-kémiai vizsgálatok együttese adja a legtöbb esetben a feladat megkövetelte kellő mélységű információt (pl. bioremediációs folyamatok). Ezen paraméterek meghatározása a környezeti mikrobiológiában a kiindulópont, az alap, amelyre építkezve juthatunk tovább (lásd 3. és 7. ábra; 21. és 26. lap). Az ilyen adatokból nyerhető információ mélységét mutatjuk be a következő vizsgálati eredményekkel.

A magyarországi sekély állóvizeink esetén kevésbé kutatott kérdés a rétegzettség kialakulása és tartóssága (Bárdosi és mtsi, 2000; Grigorszky és mtsi, 2000; Padisák és Reynolds, 2003). A víztestben és az üledékben lejátszódó mikrobiális anyagforgalmi folyamatok pedig alapvetően meghatározzák a vízi életterek működését, a bekövetkező változások irányát. Az Óhalászi-Holt-Tisza esetében a víztestben zajló folyamatokat megfelelően kiválasztott fizikai, kémiai és mennyiségi mikrobiológiai módszerek segítségével vizsgáltuk és elemeztük a mikróbaközösségek szintjén megnyilvánuló változásokat (Teszárné és mtsi, 2003; 2005; Teszárné, 2006).

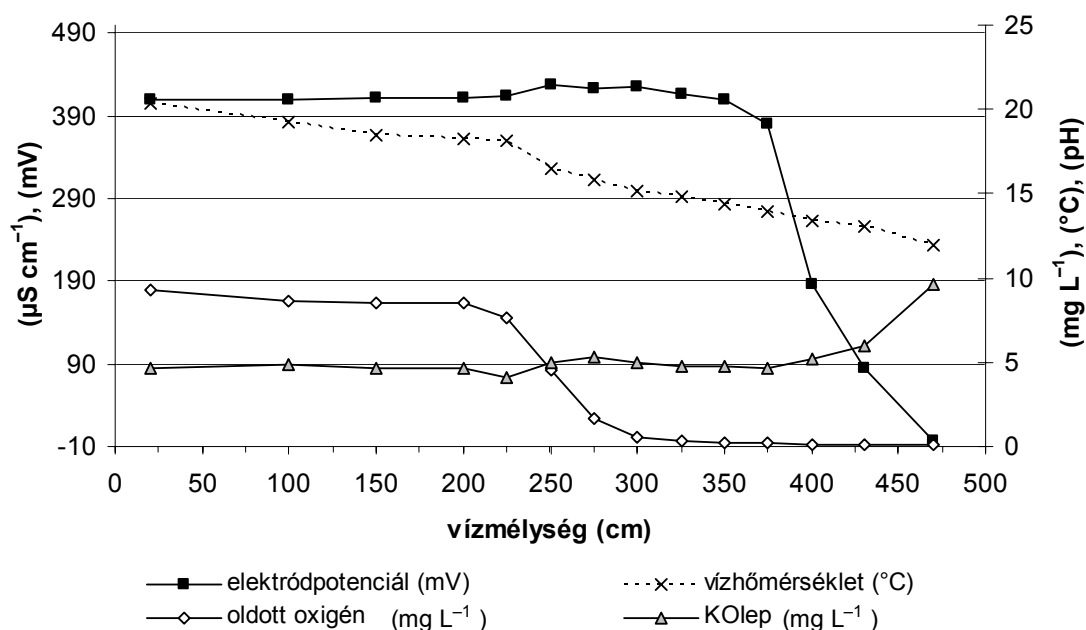
A tavaszi négy mérősorozat adatainak elemzése alapján megállapíthattuk, hogy a kora tavaszi (március–április) és a májusi mintavétel mérési adatai lényegesen eltérőek lehetnek. Kora tavasszal a vízoszlop egységes. A fizikai és kémiai változók görbéinek lefutása egyenletes, a vízoszlopban rétegződés nem tapasztalható (20. ábra). Ezt mutatják a vízhőmérséklet, az oldott oxigén, az elektród (redox) potenciál és a szerves anyagok mennyiségére utaló kémiai oxigénigény adatai. 2003. májusában ugyanakkor határozott grádiensek alakultak ki (21. ábra). A mintavételt megelőző kedvező időjárás hatására hőmérsékleti gradiens jött létre, a felszín és a fenék közeli víztömeg hőmérséklet-különbsége $\Delta t = 8,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a vízoszlop (sűrűségi adatok alapján számolt) relatív stabilitása (RWCS) 170. A stabilitás értéke közel akkora, mint 2002. júliusában (RWCS = 179), egy tartósan meleg nyári időszakban. Az oxigén gradiens a felszín közeli $9,3\text{ mg L}^{-1}$ oldott oxigén mennyisége (102,7 %-os telítettség) és a 4,0 m-es mélységben mért 1 mg L^{-1} érték között változott. Az elektród (redox) potenciál 3,75 m-es mélységben hirtelen csökkenni kezdett (381 mV-ról 187 mV-ra zuhant), majd a víz-üledék határán negatív lett (-3 mV). További grádiensek (szabad széndioxid, ammónium-ion, nitrát, szulfát, szulfid, összes vas, *Clostridium* szám mennyiségének mélységi változása) is jelzik a májusi rétegzettség kialakulását.

A tavaszi minták eredményeinek értékelése alapján megállapíthatjuk, hogy a kora tavaszi időszakban (március–április) a vízoszlop keveredett állapotban van. Május elején a tartósan szélcsendes meleg időszakokban a hőmérsékleti gradiens kialakulását a mikrobioló-

gial folyamatok nyomán a kémiai grádiensek megjelenése követi, a kémiai és biológiai komponensek függőleges változását tekintve a vízoszlop direkt rétegződést mutathat.



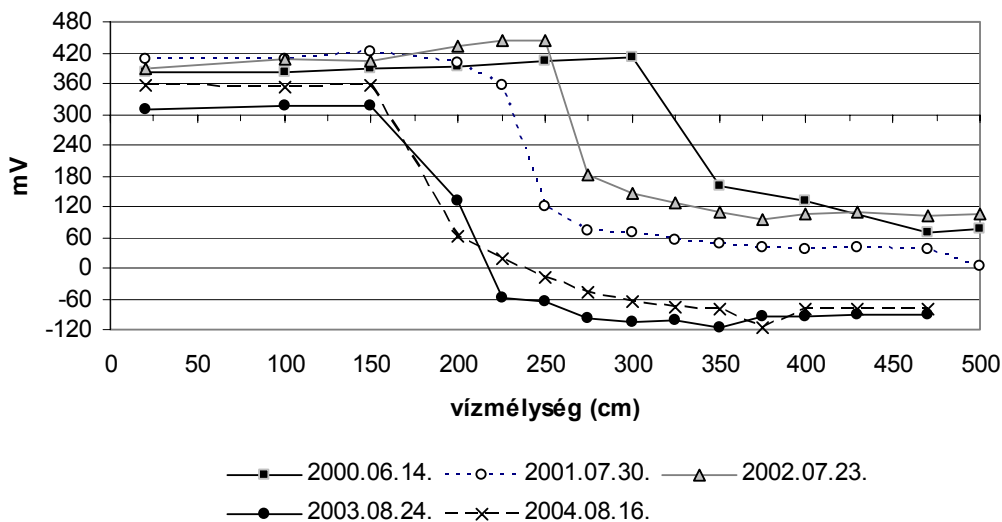
20. ábra. Néhány fizikai és kémiai mutató mélységi változása az Óhalászi-Holt-Tiszában 2004. március 22-én.



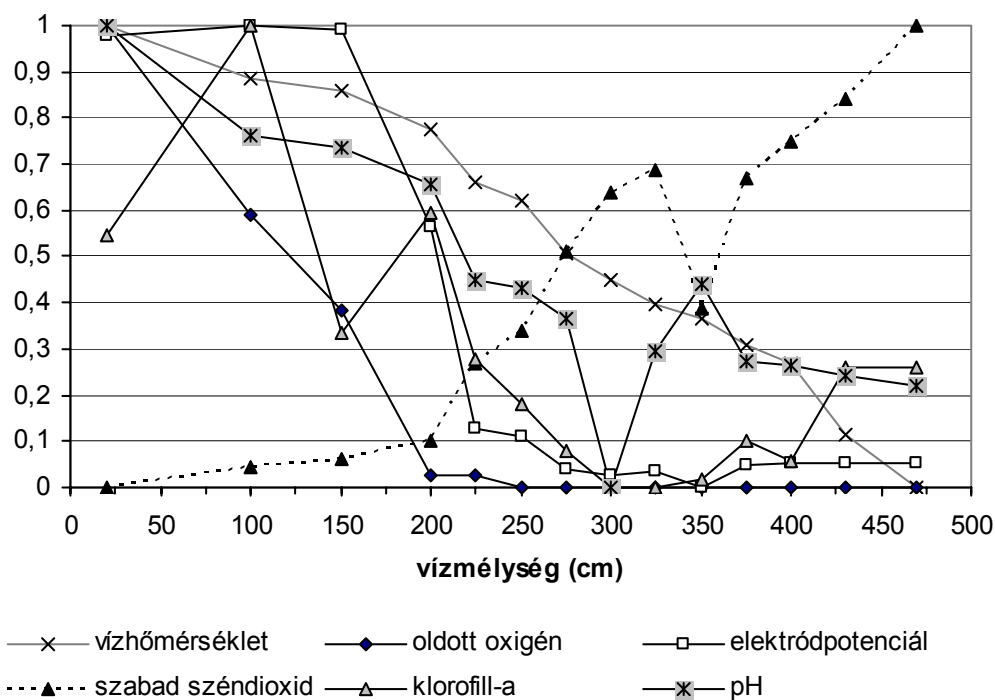
21. ábra. Néhány fizikai és kémiai mutató mélységi változása az Óhalászi-Holt-Tiszában 2003. május 05-én.

Valamennyi nyári mintázás alkalmával tapasztaltuk a direkt rétegződés meglétét: a felső réteg (epilimnion), a váltóréteg (metalimnion) és az alsó réteg (hipolimnion) kialakulását. A hőmérsékleti váltóréteg (termoklin) mellett minden alkalommal kimutatható volt a ké-

miai váltóréteg (kemoklin) is. Ezt jelzik a "klinográd típusú" oldott oxigén és oxigéntelítettségi görbék. 275 cm-es vízmélység alatt az oxigéntelítettség 1 % alatti, ami meghatározó a mikrobiális közösségek összetétele és működése szempontjából.



22. ábra. Az elektród (redox) potenciál mélységi változása az Óhalászi-Holt-Tiszában a nyári méréseink során.



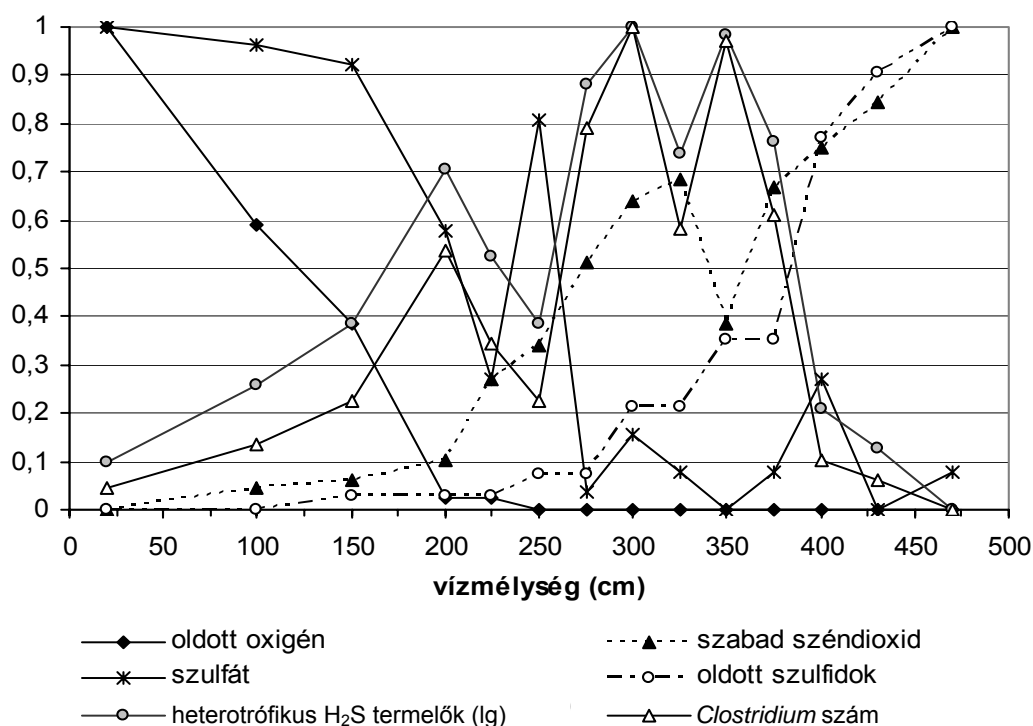
23. ábra. Jellegzetes a fizikai és kémiai (terjedelemmel standardizált; Sokal és Rohlf, 1981) jellemzők alakulása az Óhalászi-Holt-Tiszán a vízmélység függvényében 2003. augusztus 24-én.

A 22. *ábra* szemlélteti, hogy valamennyi nyári mintázás alkalmával volt egy olyan vízréteg (150–325 cm között), ahol ugrásszerűen megváltoztak az oxidációs-redukciós viszonyok a vízoszlopban. Az elektród (redox) potenciál értékei +444 és –117 mV között ugrásszerűen változtak. Mivel az elektródpotenciál a vízben oldott anyagok mennyiségének és minőségének függvénye, értéke rendkívül nagy jelentőségű a vízi anyagforgalom jellemzésében.

A 23. és 24. *ábrán* feltüntettük mindazokat a jellemzőket, amelyek jól mutatják a rétegzettséget. A grafikonokon megfigyelhető a hőmérsékleti és oxigén grádiens kialakulása. Az oldott oxigén 2 m-es mélységben elfogy, anaerób körülmények alakulnak ki. Az anaerób szervesanyag lebontó és ásványosító folyamatok következtében a szabad széndioxid mennyisége (2 m-es mélységtől lefelé) növekszik, elsősorban feltehetően azért, mert a CO₂ fogyasztó - leginkább fotoautotróf - szervezetek fény híján nem működhetnek. 3 m-es mélységben a pH és a szabad széndioxid görbéjének lefutása egymással ellentétes. A víz pH-jától függ, hogy a vízben a széndioxid milyen mértékben oldódik, és hogy a szabad széndioxid - hidrogénkarbonát - karbonát rendszer komponensei milyen arányban vannak jelen, és - viszont - a CO₂ mennyisége befolyásolja a pH-t. Ha a pH csökken, akkor egyre inkább a szabad széndioxid felé mozdul el a pufferrendszer egyensúlya. Megjegyezzük, hogy a pH-nak az *ábrán* látható drasztikusnak tűnő változása az ábrázolás sajátossága, a valóságban a változása még 1 pH egységet sem jelent. A 23. *ábra* szemlélteti, hogy 200–225 cm-es mélységben található az a zóna, ahol a vízoszlop oxidációs-redukciós viszonyai ugrásszerűen megváltoznak. Ezt jelzi az elektród (redox) potenciál hirtelen esése is. Ugyanebben a zónában a mikrobiális aktivitás (pl. heterotrófik H₂S termelők) következtében hirtelen lecsökken a szulfát mennyisége (24. *ábra*), növekedni kezd az oldott szulfidok, az ammónium-ion és a szabad széndioxid koncentrációja. Megjegyezzük (bár ebben az *ábrában* nem tüntettük fel), hogy a fajlagos elektromos vezetőképesség a mélységgel határozott növekedést mutat. A fenék közelében a tározót feltöltő Tisza víz vezetőképességének kétszerese mérhető nyári időszakban (téli akár ötszöröse is). Ez is jórészt az ásványosítási folyamatok hatásának tudható be, bár a továbbiakban látni fogjuk, hogy a fenék közeli kémiai viszonyokat esetleg hidrogeológiai tényezők is befolyásolhatják.

A 22 °C-on telepet képező mikroorganizmusok száma a fenék felé haladva csökken. A nyári időszak mérési eredményei szerint a rendelkezésre álló bontható szerves anyag mennyisége a mélységgel növekszik és a víz hőmérséklet is 20 °C fölé (2,5 m-es mélységig, alatta is csak 15 °C körüli értékre csökken; bár ez a mikrobaközösségek szempontjából - ez esetben - kevésbé lényeges tényező). Az oldott oxigén azonban 2 - 2,5 m-es mélységben elfogy,

így nem biztosítottak az aerób szaporodás feltételei. Az anaerób zónában (250 cm alatt) található a *Clostridium*-ok és a heterotrófikus kénhidrogén-termelők mennyiségét mutató görbe csúcsa. 2,5 - 4 m közötti mélységben, ahol nincs oxigén, de egyidejűleg jelen van szulfát, (szulfid) és nagy mennyiségű szerves anyag ($KOI = 13 - 24 \text{ mg L}^{-1}$), a *Clostridium*-ok és heterotrófikus kénhidrogén-termelők (pl. SRB) abundanciája maximális, a két görbe párhuzamos lefutású (24. ábra). A szulfitredukáló *Clostridium* típusú baktériumok száma $540 - 860 \text{ TKE } 50 \text{ mL}^{-1}$. A szabad széndioxid mennyiségének növekedése ($20 - 140 \text{ mg L}^{-1}$) ebben a zónában még kedvezhet is e kapnikus mikroorganizmusok szaporodásának.



24. ábra. A rétegzettség kialakultát szemléltető jellegzetes kémiai és mikrobiológiai (terjedéssel standardizált) adatok alakulása az Óhalászi-Holt-Tiszában 2003. augusztus 24-én.

A heterotrófikus kénhidrogén termelők maximális száma $2\,500 - 250\,000 \text{ TKE mL}^{-1}$. Megjegyezzük, hogy a szabvány szerinti *Clostridium* szám meghatározás a szulfid redukció képességének vizsgálatára épít és egy hőkezelést is alkalmazva feltételezi, hogy csak az (endo)spóráképző szervezeteket mutatja ki ezek közül is. A heterotrófikus H₂S termelés tesztben a S tartalmú aminosavakból H₂S-t felszabadító mikroorganizmusok számát vizsgálják. E két csoport egyébként (*sensu lato Clostridium* fajok és spórák szulfatredukálók, pl. *Desulfotomaculum*, valamint akár az *Enterobacteriaceae* család tagjai, más fermentálók, vagy anaerób légzők) a kérdéses biokémiai aktivitásokat tekintve átfed, vagyis akár mindkét csíra-

szám érték zömében ugyanazokra a vizsgált víztestben jellemző mikroorganizmusokra vonatkozik. Ezek pontos elkülönítése a fajok megismerése alapján lehetséges, pl. anaerób lemezeléses, vagy nemtenyésztéses eljárások segítségével hívásával.

A "planktonikus baktériumok" mennyisége és biomasszája (vagyis a mikroszkópos sejtszám) a mélységgel nem változik egyértelműen. Nehezíti az értékelést, hogy a módszernek "mérési tartományonként" igen változó a mérési bizonytalansága. Ezen túl a változás hiányának oka - rossz esetben - mérési hiba is lehet. Az anaerób mikroorganizmusok DNS-e 72 órával a mintavétel után degradálódhat, és ha a planktonikus baktériumok tartósított mintái később kerülnek feldolgozásra, a degradálódott DNS-ek nem festődnek meg (Daley, 1979). Esetünkben valamennyi vizsgálat 24 órán belül befejeződött. Természetesen az a legvalószínűbb, hogy az AODC vizsgálat eredményével szemben az összcsíraszám becsléssel mindig csak a baktériumközösség kis és változó rendszertani pozíciójú hányadát detektáljuk. A planktonikus baktériumok között a fenék közelében a nagyméretű (legvalószínűbben szulfát-redukáló) pálcák domináltak és adták a biomassza nagy részét, míg a felszín közelében a kis méretű kokkuszosok száma és biomasszája volt jelentős. Ezen eredményeink jól korrelálnak egyébként más szerzőknek a Kiel Fjord víztestén végzett vizsgálati eredményeivel (Watson és mtsai, 1977).

Fényméréseink szerint a fenék közelébe nyáron már nem jut le fény a 400 - 700 nm-es hullámhossz tartományból. Így a klorofill-a érték fenék közeli növekedése (23. ábra) feltehetően nem eukarióta algáktól származik, és a váltórétegben levő kisebb csúcs is tulajdonítható anaerób fototróf baktériumok pigmentjeinek.

Az elemi logikának ellentmond az anaerób vízrétegekben kimutatható klorofill-a maximum. A klorofill-a ugyanis a két fotorendszeres oxigéntermelő cianobaktériumok jellegzetes pigmentje (az eukarióták mellett). Aerób fotoszintézis pedig a kérdéses rétegekben mért redox (elektród) potenciál értékek, az egyéb kémiai paraméterek alapján semmiképpen sem történhetett. Az alkalmazott mérés a szabvány szerint klorofill-a-t mutat ki, amely csak eukarióta algákban, valamint cianobaktériumokban fordul elő. Tudjuk, hogy a klorofill-a méréssel a zöld kénbaktériumok bakterioklorofill-d-je és egyéb bakterioklorofill pigmentek is interferálnak. Tény az is, hogy 500 cm mélyen a kokkusz és nagyméretű pálca alakú planktonikus baktériumok egyedszáma ($6,53 \cdot 10^6 \text{ ind L}^{-1}$) és biomasszája ($0,878 \text{ g m}^{-3}$) is jelentős volt. Ha ezek egyfotorendszeres zöld és bíbor fotoszintetizáló baktériumok, akkor együttesen felelősek lehetnek a nagy "klorofill-a" koncentrációért (zöld kénbaktériumok bakterioklorofill-d-je). A natív vízminyak mikroszkópos elemzése azt mutatja, hogy a

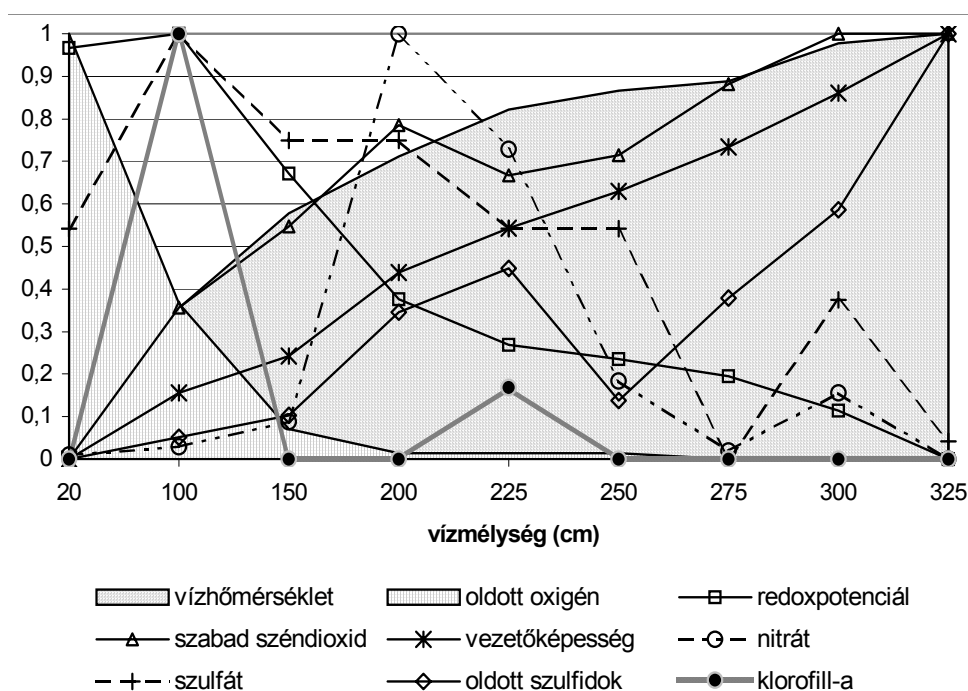
kemoklin réteg klorofill-a maximumának zónájában tényleg zöld kénbaktériumok hatalmas tömegei voltak. A fenék közeli „klorofill-a csúcs” okát feltehetően másban kereshetjük. A mikroszkópos vizsgálat itt egy *Anabaena* cianobaktérium 10^5 L^{-1} sejtszámát mutatta. A szakirodalom alapján arra következtethetünk, hogy az *Anabaena* fajok között néhány hajlamos H_2S elektrondonorral anaerób fotoszintézist végezni. Hogy a folyamat ténylegesen zajlik-e a kérdéses zónában csak fényklíma mérésekkel és megfelelő enzimaktivitás / expresszió elemzésekkel bizonyítható.

Aktív anyagcsere híján e szervezetek legfeljebb metabiotikus állapotban sülyedhetnek a fenékre. Irodalmi adatok szerint azonban az *Anabaena* képes anaerób anyagcserére (Sentsova és mtsai, 1975), sőt anaerób fotoszintézisre (Bronstein és mtsai, 2000) is. Az *Anabaena variabilis* endogén légzési rátája fokozatosan csökkent 30-40 napos sötét periódus alatt és kis szinten továbbra is fennmaradt (Sentsova és mtsai, 1975). Az irodalomban az anaerób fotoszintézis leírása a cianobaktériumok közül leginkább valamely *Oscillatoria* fajra vonatkozik. Cohen és mtsai (1975) voltak az elsők, akik ezt alátámasztották, sőt laboratóriumi körülmények között megerősítették az *Oscillatoria limnetica* oxigént nem termelő fotoszintézisét. Szintén ezt a fajt izolálták a rétegzett, magas sókoncentrációjú Sínai-tó hipolimnionjából (Cohen és mtsai, 1977) ahol az *Oscillatoria limnetica* volt a domináns fototróf 3 mM kénhidrogén koncentrációig. (A mi esetünkben a kénhidrogén koncentráció a fenék közelében 0,004 mM volt mindössze.) Ez a cianobaktérium megvalósítja az oxigént nem termelő széndioxid fotoasszimilációt a szulfid - mint alternatív elektron donor - segítségével. Az oxigént nem termelő (kénhidrogén elektron donor alapú) fotoszintézis hatékonysága nagyobb volt, mint az oxigént termelő fotoszintézisé különösen vörös fénynek való kitettség esetén (Oren és mtsai, 1977). Bronstein és mtsai (2000) klónozták és szekvenálták a szulfid-kinon reduktáz (SQR) enzimet kódoló gént. Ez az enzim katalizálja az oxigént nem termelő fotoszintézis első lépését az *Oscillatoria limnetica* cianobaktérium szervezetében. A nukleinsav adatbázis keresés során egy *Anabaena* sp. (PCC 7120) cianobaktérium genomjában SQR homológ bázissorrendet találtunk. A *Microcoleus chthonoplastes* - egy kozmopolita tengeri cianobaktérium - szintén képes megvalósítani az oxigént nem termelő fotoszintézist, szulfidot használva elektron donorként (Cohen és mtsai, 1986).

Az őszi minták eredményeinek értékelésekor egyértelművé vált, hogy a fizikai és a kémiai, valamint a biológiai változók értékei ebben az időszakban nem módosulnak számottevően a vízmélységgel. A vízhőmérséklet és a sűrűség értékei alapján kiszámítottuk a vízosz-

lop relatív stabilitását, ami őszi időszakban 1,4 - 4,0 közötti érték, évszakos viszonylatban a legkisebb. Az átkeveredő víz mikrobiológiai szempontból is - mintegy - homogenizálódik.

A téli mintázás mérési eredményeit feldolgozva megállapíthatjuk, hogy 2 - 3 hetes jégfedettség feltehetően nem elegendő az indirekt rétegzettség kialakulásához. Ehhez 5 - 10 hétig tartó jégborítás szükséges az Óhalászi-Holt-Tisza esetében. Ekkor már kialakul a hőmérsékleti gradiens: a víz hőmérséklete közvetlenül a jég alatt 0,2 °C volt, 1 m-es mélységben már 1,8 °C, míg a fenék közelében 4,7 °C (25. ábra). A vízoszlop relatív stabilitása 14. A jégborítottság időtartamán túl lényeges kérdés a vizet takaró jég és hó fényáteresztése is. Az általunk vizsgált esetben csak 200 cm alatt anaerób a víztömeg, a szabad széndioxid és az oldott szulfidok mennyisége a lebontási folyamatok következtében a fenék felé fokozatosan nő. A peptonból kénhidrogént termelők száma 250 cm-es mélységben volt a legnagyobb (25. és 26. ábra).



25. ábra. Az Óhalászi-Holt-Tisza vízterében mért kémiai paraméterek terjedelemmel standardizált értékeinek változása a vízmélység függvényében 2003. március 4-én, jég alatt.

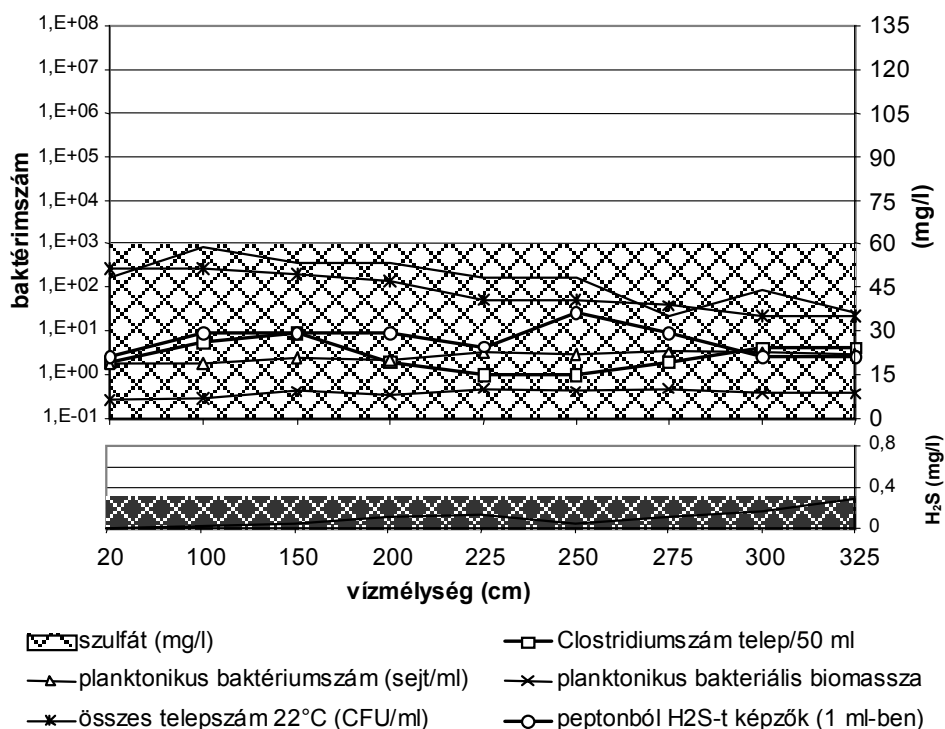
A 22 °C-on telepképző aerób heterotróf baktériumok legnagyobb számban közvetlenül a jég alatti mintából voltak kimutathatók. A fenék közelében, ahol a *Clostridium* típusú baktériumok száma növekedett, a keletkezett szulfid mennyisége maximális volt (0,290 mg L⁻¹), míg a szulfát tartalom jelentősen lecsökkent. Ennek oka lehet, hogy oxigén hiányában itt a

szulfátlégzés vált dominánssá. A szulfátredukáló baktériumok energianyerés céljából a megtermelt szerves anyag mellett (terminális elektron akzeptorként) fogyasztották a vízben lévő szulfát-ionokat, miközben redukáltabb kénvegyületek és széndioxid szabadult fel. A planktonikus baktériumszám a 225 - 275 cm közötti rétegben volt a legjelentősebb (26. ábra). A planktonikus baktériumok közül a felszín közelétől kb. 150 cm-es mélységig a pálca és kokkusz alakú baktériumok száma közel azonos volt. A fenék felé haladva, 200 - 325 cm mélységig a kis- és nagyméretű kokkuszok adták a baktériumszám és biomassza jelentős hányadát. A klorofill-a tartalom 100 cm mélyen ért el maximális értéket ($59,2 \text{ mg m}^{-3}$) és 225 cm-en még egy kisebb csúcsa volt. Az algológiai vizsgálatok szerint azonban ezúttal *Cryptomonas* fajok domináltak az egyes vízrétegekben. Ezek a szervezetek autotrófok (de fakultatív mixotrófok is lehetnek), klorofill-a-t és fikocianint is tartalmaznak, tipikus "jég alatti" mikróbák. A klorofill-a csúcsoakat abban a két rétegben mértük, ahol ezek a szervezetek nagy számban fordultak elő (100 cm mélyen). Érdekes jelenség, hogy a *Cryptomonas*-ok tenyésztetben is hasonlóképpen viselkednek, miként a jég alatti rétegzettségben tapasztaltuk. Két populációra válnak. Egyik populáció a felszín közelében (esetünkben 100 cm mélyen) a másik populáció a mélyebb rétegekben fordul elő (225 - 250 cm-en). Ennek okát jelenleg nem ismerjük. (Lehetséges, hogy két *Cryptomonas* faj volt a két vízmélységben, vagy egy faj két ökotípusa [Hoef-Emden és Melkonian, 2003].)

Az Óhalászi-Holt-Tisza legmélyebb pontján végzett 15 mérésorozat eredményeit összegezve megállapíthatjuk, hogy a holt meder keveredési típusa labilis dimiktikus, hajlamot mutat a polimiktikus jellegre. Időjárástól függően kialakulhat a nyári direkt és a téli indirekt rétegzettség. Kora tavasszal a vízoszlop még keveredett állapotban van, a direkt rétegződés május elején kezdődik, júliusra stabillá válik, ami 4 - 5 hétig stagnál, majd októberre erodálódik. Nyári időszakban kialakul a hőmérsékleti és a kémiai váltóréteg. Mérési adataink alapján bizonyossá vált, hogy 2 - 3 hetes jégfedettség nem elegendő a téli fordított rétegzettség létrejöttéhez, de > 5 hetes tartós jégborítottság esetén már kialakulhat.

A váltóréteg kialakulását jelzik a klinográdféles típusú oxigéngörbék, az elektród (redox) potenciál hirtelen esése, a szulfát-szulfid profil, *Clostridium* csíraszámok, a klorofill-a érték alakulása. Míg az összes telepszám (22 °C-on) vertikális megoszlása az aeróbitási viszonyokat követi, az anaerób *Clostridium*-ok és a peptonból kénhidrogént termelők mennyisége a 3,0 - 4,0 m-es (anaerób) zónában a legnagyobb. Ebben a mélységben nagy mennyiségben áll rendelkezésre könnyen bontható szerves anyag és szulfát is. Aktív anyagcseréjük következményeként a felszabaduló oldott szulfidok, a szabad széndioxid és az ammónium-ion mennyi-

sége a fenék felé haladva növekszik. A planktonikus baktériumszám és biomassza eredmények elemzése során megállapítottuk, hogy sem a szám, sem a biomassza a mélységgel nem változik számottevően.



26. ábra. Az Óhalászi-Holt-Tisza vízterében mért bakteriológiai jellemzők alakulása a vízmélység függvényében 2003. március 4-én, jég alatt.

A kémiai és mikrobiológiai adatok között pár esetben ellentmondás tapasztalható: nem magyarázható meg az anaerób szulfátredukáló mikrobák nagy csíraszama mellett a fenék közelében tapasztalt nitrát koncentráció növekedés. 2003. telén pl. anaerób körülmények között 275 - 325 cm-es mélységben $0,8 - 2,4 \text{ mg L}^{-1}$ nitrát koncentrációt mértünk (25. ábra). Aligha képzelhető el azonban domináns mértékben szulfátlégzés ilyen nitrát szintek jelenlétében. Az ellentmondás oka az, hogy a nitrát hatásos kompetitora a szulfátredukciónak, mert a szerves anyagok nitrát légzése energetikailag kedvezőbb a szulfátlégzésnél.

A 2001. évi nyári minták feldolgozása során tapasztaltuk először azt, hogy a mintában előforduló Fe^{2+} ionok nagy koncentrációja ($> 5 \text{ mg L}^{-1}$) zavarja a nitrát meghatározását (nagyobb nitrát értéket kapunk, mint a tényleges). A mintákat kationcserélő oszlopon (Varion KS) átvezetve (MSZ 12750-18) a nitrát koncentrációja már alsó méréshatár alatti ($< 0,5 \text{ mg L}^{-1}$) lett. Mivel 2003. telén ismét nagy volt az anaerób víztömegből származó minták összes vas ($8,5 - 20,4 \text{ mg L}^{-1}$) és a nitrát ($2,6 - 18,4 \text{ mg L}^{-1}$) koncentrációja is, hasonlóan jártunk

el. A kationcserélőn átvezetett vízminta nitrát koncentrációja azonban továbbra is igen nagy maradt (0,8 - 11,1 mg L⁻¹). Ebből egyértelműen arra következtethetünk, hogy a fenék közelében a nitrátnak valamilyen külső forrásból kell származnia. Tóth és Almási (2001) hidrogeológiai kutatásai szerint a Kiskörei-tározó Poroszlói- és Tiszavalki-medencéket érintő szakaszán 50 km átmérőjű körzetben, felfelé áramló felszínalatti vízmozgás figyelhető meg, amit a terület alatti mélyszerkezeti törések tesznek lehetővé. Ennek a kiáramlási (csapolási) területe lehet az Óhalászi-Holt-Tisza is (Szalma, 2003). Erre utalhatnak a fenék közelében mért kémiai eredmények (vízhőmérséklet, vezetőképesség, ionok, stb.) "anomáliái" is.

Felhívjuk még a figyelmet az összcsíraszám és a planktonikus baktériumszám közötti három nagyságrend értékű különbségre. Ez a Bevezetés fejezetben már említett „great plate anomaly” jelenséggel függhet össze: a tenyésztésen alapuló csíraszámolás jelentősen alulbecsli a mikróbaszámot a fluoreszcens mikroszkópi elemzéshez viszonyítva.

A kutatás kénkörforgalommal, anaerób klorofill-a csúcsokkal, csíraszám anomáliával kapcsolatos magyarázatai sajnos az alkalmazott mikrobiológiai technikák korlátai miatt jó-részt csak feltételezések maradnak. A hipotézisek bizonyítása, a kérdések megválaszolása törzsekre alapozott és molekuláris módszerek alkalmazása segítségével lehetséges (pl. Teske és mtsai, 1996). Megjegyezzük ugyanakkor, hogy a tenyésztés-izolálás módszere az anaerób tenyésztés extrém nehézségei miatt (tapasztalatunk szerint pl. 100 izolátumból 1 - 2 tartható fenn) sem valódi megoldás. Vagyis a diverzitási kérdések megválaszolása, a zöld kénbaktériumok, az *Anabeana* fajok aktivitásának *in situ* meghatározása feltehetően nemtenyésztéses molekuláris módszerek segítségével hívásával oldható meg.

V.2. Törzsek vizsgálatán (tenyésztés, izolálás) alapuló eljárások eredményeinek összevetése a teljes nukleinsav kivonásra épülő diverzitásvizsgálat eredményeivel

A környezeti mikrobiológiai kutatások hagyományos (évszázados) módszere a tenyésztésen, törzsek izolálásán és vizsgálatán alapuló diverzitásvizsgálat. Ez esetben már képet kapunk arról, hogy az előző fejezetben csak számszerűen megismert mikróbacsoportokat (22 °C-on telepképzők, pl.) mely szervezetek alkotják. Az e területen végzett szerteágazó munkák eredményeiből a pangó vizes környezetek egy különleges élőhelyét választottam bemutatásra. A pangó vizes területek egyik jellegzetes növénye a keskenylevelű gyékény (*Typha angustifolia*), amelynek különleges tulajdonsága, hogy nagyon kis redoxpotenciálú közegekbe (pl. lápi általajok) gyökerezve is megél. A gyékény aerenhimatizált gyökerei jól jelzik az adaptáció tényét, ugyanakkor tudnunk kell, hogy az anaerób általaj toxikus

mikrobiális anyagcseretermékeit (fermentációs savak, NH_3 , H_2S stb.) a gyökérfelszín mikróba partnerei a növénygel kooperálva méregtelenítik. Ennek a különleges növény-mikróba együttműködési térnek, amely fizikai-kémiai szempontból is átmeneti (gradiens) zóna a vizsgálata biodiverzitás kutatásaink egyik központi eleme. Az általajba ágyazott gyékény gyökér-blokkokat egy az Óhalászi-Holt-Tiszához sok tekintetben hasonló területen gyűjtöttük be. A Soroksári-Duna egyik holtágának gyékényes úszólápjából vettünk mintát.

A keskenylevelű gyékény rizoszféra - rizoplán mikróba közösségeinek tenyésztésen alapuló fenotípusos fajdiverzitás vizsgálatába három évszakban (nyár, ősz, és tavasz; VI.1.2. pont, 47. lap) izolált összesen 213 törzset vontunk be (164 Gram-pozitív, 49 Gram-negatív bizonyult). A csíraszámolás eredménye 1 - 1 g-nyi gyökér-homogenizátumra vonatkoztatva mind B, mind pedig módosított B tápközegen 10^6 nagyságrendűnek bizonyult. Az érték felületre történő átszámítása -sajnos - lehetetlen (becslés persze végezhető, de a gyökér tényleges, baktériumokkal borított felületének számítása nagyságrendnyi hibával terhelt). A taxometriai fajmeghatározást a Biolog automata identifikációs rendszerrel nyert eredményekkel is segítettük. A fenonokat a 10. táblázatban soroljuk fel. Az egyes fenonokból nyert csoportrepresentatív törzseket utóbb 16S rDNS alapú filospéciesz meghatározásnak vetettük alá. Az eredményt a 27. ábrában mutatjuk be.

A törzsfán látható adatokat a „klasszikus”, fenetikus bélyegek alapján meghatározott rendszertani besorolásokkal (10. táblázat) összevetve meglehetősen vegyes kép tárul elénk. Számos egyezés mellett néhány esetben a molekuláris adatok alapján a taxometriai besorolásokat revideálnunk kellett. A Gram-pozitívok között felsorolt 1h. fenont *Agrobacterium tumefaciens*-ként azonosítottuk. Az 1d. fenon eredetileg *Micrococcus* nemzetségbe sorolt tagjai *Xanthobacter flavus*-nak bizonyultak. E meglehetősen durva félrehatározás hátterében az α -proteobaktériumok sejtfalának erőteljesebb festék visszatartási képessége áll, amely gyakran téves Gram-pozitív reakciót eredményez. A Gram-reakció mind a klasszikus, mind a Biolog gyorsidentifikáló rendszerben az egyik legelső dichotomikus kulcsbélyeg. Vagyis a helytelen Gram festési diagnózis vezetett tévútra. Az 1c. fenon törzseit a 16S rDNS bázissorrend elemzés *Arthrobacter agilis*-nek, ill. *Agrococcus jenensis*-nek határozta meg, így az eredeti *Deinococcus* nemzetségbe sorolást revideálni kellett. Az 1e. fenon az előzetes meghatározással egyezően *Micrococcus luteus*-t adott. Az 1f. fenon korábban egységesen *Staphylococcus* sp.-ként behatárolt tagjai a molekuláris adatok alapján két nemzetségbe sorolódtak. 2 törzs a *Staphylococcus warneri* fajt reprezentálta, a TA68 és TAGA27 törzsek molekuláris elemzése a *Kocuria* nemzetségben belül két, a tudományra eddig ismeretlen faj felfe-

dezését eredményezte, melyeket *Kocuria palustris* és *K. rhizophila* néven írtunk le (Kovács és mtsai, 1999).

Az abszolút domináns 1a. fenonból összesen 34 törzs 16S rDNS bázissorrend elemzését végeztük el. A törzsek mindegyike a *Bacillus pumilus* fajba tartozott. Mind a fenon, mind pedig a klád meglehetősen heterogén. Figyelembe véve a *Bacillus* nemzetség tagjain belüli nagy genetikai variabilitást és az ennek háttérében meghúzódó kiemelkedő (10^{-7}) természetes transzformációs gyakoriságot, ez a variabilitás nem tűnik megmagyarázhatatlannak (Lorenz és Wackernagel, 1994; Amann és mtsai, 1995). Az 1b. fenon tagjai a *Paenibacillus amylolyticus*-szal (basonym: *Bacillus amylolyticus*) azonosak. Az 1g. fenon a molekuláris adatok alapján is a *Micromonospora* nemzetségbe tartozott, besorolását *M. fulvoviolaceus*-ként pontosíthattuk.

Fenon	A taxometriai fajazonosítás eredménye*	Törzsek	
		száma	aránya
1a.	<i>Bacillus pumilus</i> (TA99, TA130, TAG19)	122	57,3
1b.	<i>Bacillus circulans</i> (TA35)	6	2,9
1c.	<i>Deinococcus</i> sp. (TAGA42, TA8)	3	1,5
1d.	<i>Micrococcus</i> sp. (TA4)	3	1,5
1e.	<i>Micrococcus</i> sp.	5	2,3
1f.	<i>Staphylococcus</i> sp. (TA27, TA68, TAGA27)	6	2,8
1g.	<i>Micromonospora</i> sp. (TAGA44)	4	1,9
1h.	Aerób korineform (TA92)	**15 + 1	7,0
2a.	<i>Acinetobacter</i> genospéciesz a. (TAG50, TAGA3)	11	5,2
2b.	<i>Flexibacter</i> sp.	2	1,0
2c.	<i>Acinetobacter</i> genospéciesz b. (TAGA17, TAGA15)	24	11,3
2d.	<i>Erwinia</i> sp. (TA14)	1	0,5
2e.	<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	0,5
2f.	<i>Enterobacter amnigenus</i> (TA84)	6	2,8
2g.	<i>Enterobacter agglomerans</i>	**3 + 1	1,5
15	Mindösszesen	213	100,0

*zárójelben a filospéciesz azonosításban bemutatott törzsek száma (27. ábra)

**e fenonoknál 1-1 törzs csak jelentősen nagyobb átlag hasonlósággal tartozott az egyébként homogén csoporthoz

10. táblázat. A Soroksári-Dunából vett gyékényminták rizoplán baktériumközösségeinek összetétele a tenyésztésbe vont törzsek fenetikai bélyegekre alapozott azonosítása szerint.

A Gram-negatív törzsek 2a. fenonja az *Acinetobacter lwoffii*, míg a 2c. fenon az *A. radioresistens* fajba tartozó törzseket egyesít. A 2b. fenon *Flexibacter* nemzetségbe sorolt tagjai a molekuláris vizsgálatok elvégzésének idejére kipusztultak. A 2e., 2f., 2g. fenonok tagjainak rendszertani besorolását revideálni kellett. A molekuláris vizsgálatok eredménye

alapján egységesen a *Rahnella aquatilis*-t reprezentálják. A 2d. fenon *Klebsiella pneumoniae*-nak adódott. Az Enterobacteriaceae családban e nemzetségek (*Enterobacter*, *Rahnella*, *Erwinia*, *Klebsiella*) tagjainak elkülönítése különösen a környezeti (nem humán) izolátumok esetében fenotipikai bélyegek alapján nagyon nehéz. A nemzetségek (*Klebsiella*), sőt fajok egy része ráadásul genetikai értelemben sem homogén (nem monofiletikus). Az Approved list (Skerman és mtsai, 1980) taxometriai alapokon nyugvó védett nevei a filogenetikai érvényű reklaszifikációt egyelőre nem teszik lehetővé.

A *Typha angustifolia* rizoplánja komplex mikróbaközösségének sajátossága, hogy szemben a - főként mezőgazdasági - növények körében végzett korábbi rizoszféra - rizoplán vizsgálatokban nyert Gram-negatív dominanciával, esetünkben egyértelmű a Gram-pozitív baktériumok túlsúlya, a *Bacillus pumilus* tömeges jelenlétével. Lényeges továbbá, hogy a tavaszi, nyári és őszi mintavétel során részarányuk állandónak bizonyult, nem "szezonális". A Gram-pozitív dominanciát, valamint az egyes fajok közösségen belüli részarányát elemezve figyelembe kell venni az általunk használt izoláló tápközeget. Az ugyanis nyilvánvalóan befolyásolja a tenyésztetbe vont szervezetek spektrumát. A "szokásos húspepton" közeg helyett a keményítő - élesztőkivonat - tőzegkivonat táptalajt alkalmaztuk. Meggyőződésünk azonban, hogy a törzseink élőhelyét jelentő növény a fajok tekintetében lényegesebb tényező.

A gyékényhez hasonló ökológiai igényű rizs gyökerén, saját eredményeinkhez hasonlóan szintén *Bacillus* dominanciát mutattak ki (Lu és mtsai, 2004). Egyes szerzők a *Bacillus* dominanciát a közeg nagy nedvességtartalmára vezetik vissza (Watanabe és Furusaka, 1980). Azt tapasztalták, hogy a rizs tenyészidejének száraz periódusával szemben - ahol a Gram-negatív baktériumok számaránya jelentősebb - elárasztás során elsősorban *Bacillus* és aktinobaktérium fajok előretörése figyelhető meg. Ez a dinamika arra is utal, hogy a *Bacillus*-ok zömében aktív - és nem spórás - alakban vannak jelen. Érdekes, hogy a teljesen más tenyész körülmények között élő teacserje rizoszférájában *B. subtilis* és *B. mycoides* fajok dominálnak. Pandey és Palni (1997) ezt a rizoszféra közeg kis pH-jával hozta összefüggésbe. Feltehető, hogy esetünkben a *B. pumilus* túlsúlyát több környezeti paraméter (vízzel átitatott talaj, kisebb pH és redoxpotenciál) együttese, továbbá a *B. pumilus* esetleges amenzalista hatása határozza meg. Az ökológiai tényezők elsődleges szerepét látszik alátámasztani, hogy a nílusi papirusz (*Cyperus papyrus* L.) rizoplánban úgyszintén *B. pumilus* dominanciát sikerült kimutatni (Rifaat és mtsai, 2002) aktinobaktériumokra szelektív (alkalmazott szénforrások: keményítő, kazein, maláta-kivonat) tápagar lemezekén.

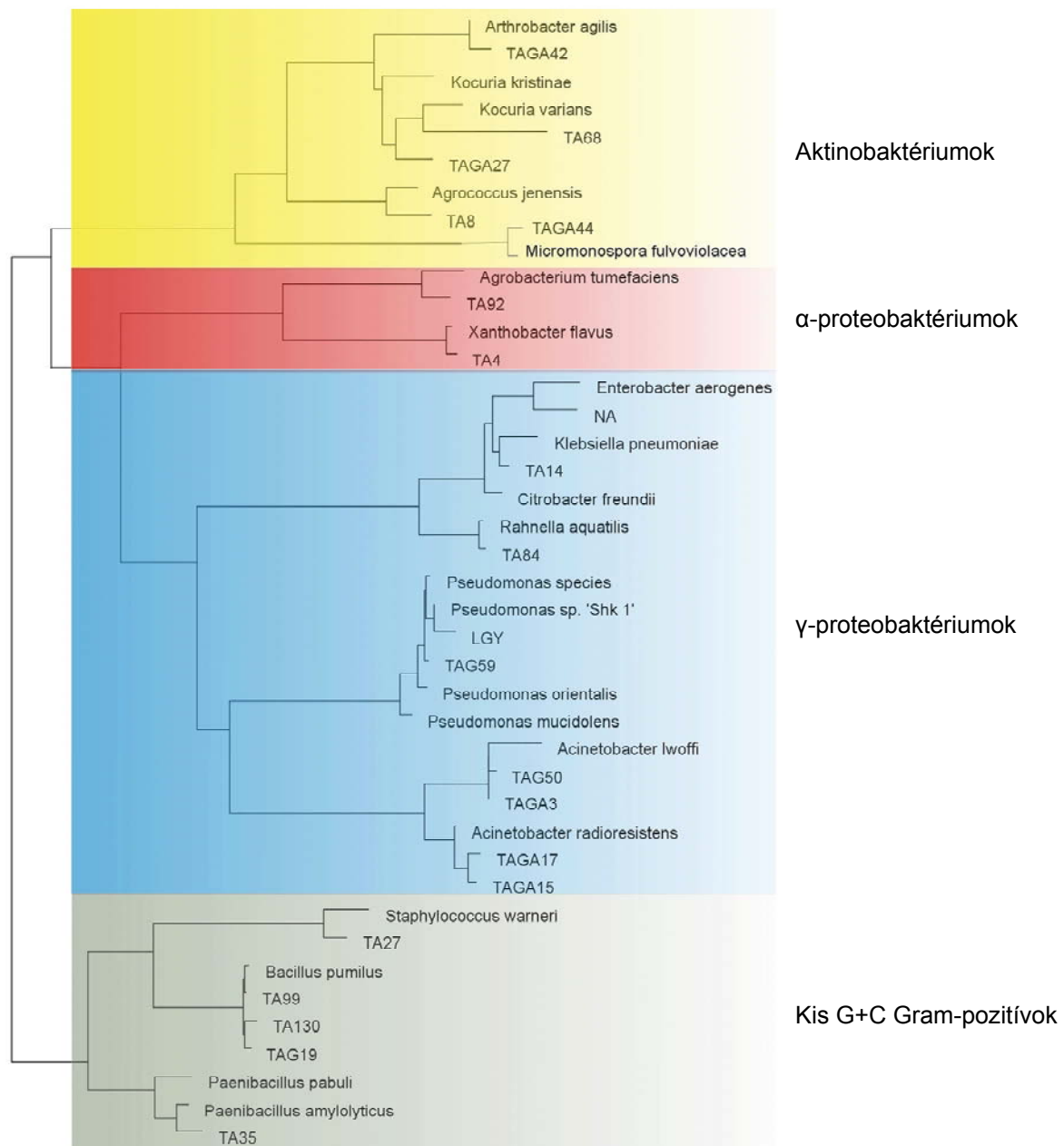
Érdekes a *Staphylococcus Warneri* jelenléte a rizoplánban. Ezt a fajt bőrfelületekről írták le. Esetünkben a minták külső szennyeződése (hacsak nem a Soroksári-Duna szennyvíz

terhelése játszik közre) nagy valószínűséggel kizárható. A *Staphylococcus* nemzetség tagjainak környezeti előfordulására, akár a növényi rizoplánban több példát találunk. Rifaat és mtsai (2000) *T. angustifolia* rizoplánján végzett párhuzamos vizsgálatai szintén *Staphylococcus* sp. jelenlétét igazolták. Hasonló eredménytől számol be Tejeda-Mohica (1993) paradicsom rizoplán vizsgálata is. Hangsúlyoznunk kell, hogy a *Staphylococcus* nemzetség tagjainak előfordulása talajokban és vizekben elsősorban az antibiotikum rezisztencia kifejlődésének szempontjából igen nagy jelentőségű. A környezeti rezervoár fontos lehet új (esetleg fokozott virulenciájú) törzsek kialakulásában is.

Tudományos újdonságnak számít két új *Kocuria* faj, a *K. palustris* és *K. rhizophila* kimutatása a keskenylevelű gyékény rizoplánjából. Szerepük a *T. angustifolia* gyökerén még tisztázásra szorul. E fajokat utóbb sok környezetből, köztük kolbászból és más érlelt húсарukból (pl. Isolini és mtsai, 2007), tengeri üledékekből (Gontang és mtsai, 2007) is kimutatták. A *Kocuria rhizophila*-t egyébként Johnson és mtsai (2002) a kéz rezidens mikrobiótája tagjaként izolálták egy fertőtlenítőszer tesztben TSA agaron. A *K. rhizophila* teljes genom bázissorrendjét legújabban japán kutatók meghatározták (Takarada és mtsai, 2008). Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a legkülönbözőbb növényi eredetű fenolos anyagok bontására képesek és gyökér exudátumok hasznosításában is részt vállalhatnak.

Az *Arthrobacter agilis* jelenléte nem meglepő. Azon túl, hogy széles körben előforduló talajbaktérium, az *Arthrobacter* nemzetség tagjait növényi gyökerekről korábban is leírták (Sato és Jiang, 1996). Az *Agrococcus jenensis*-t eredetileg homokkő felszínéről izolálták (Groth és mtsai, 1996), rizoplánban történő előfordulását - tudomásunk szerint - mindeddig nem publikálták. Egy párhuzamosan zajló kutatás szerint egyébként a késő tavaszi (május) gyékény rizoplán minták aktinobaktérium közösségeit *Micromonospora* és más monospórás aktinobaktériumok alkották, vagyis a *Micromonospora* fajok szerepe a gyékény gyökerén igazolást nyert. Érdekes módon ősszel ellenben a rizoplánban dominanciára jutnak a *Streptomyces* nemzetség tagjai (elsősorban a *St. anulatus* és *St. albidoflavus*) (Rifaat és mtsai, 2000).

A Gram-negatív baktériumok jelentős részét az *Acinetobacter lwoffii* és *A. radioresistens* fajba tartozó baktériumok alkották. Ez jól egybevág Brunel (1992) észleleteivel, aki terrersztris lápon élő keskenylevelű gyékény domináns denitrifikáló baktériumait *Acinetobacter* típusúként jelölte meg. Előfordulásuk szezonális dinamikát mutat: míg az őszi mintavétel esetében a baktériumközösség domináns tagjai voltak, a nyári mintavétel során jelenlétüket nem sikerült kimutatni. A Gram-negatív törzsek között arányukat tekintve második az *Agrobacterium tumefaciens*. E faj régóta ismert növényi kórokozó, tumor indukáló



27. ábra. A gyékény rizoplánból tenyésztésbe vont törzsek filogenetikai helyzetét bemutató dendrogram. A fát neighbour joining módszerrel készítettük, a méretvonal 10 % nukleotid különbséget jelöl. A fa gyökerének a *Clostridium thermoautotrophicum*-ot jelöltük ki (az ábrán nem tüntettük fel). A könnyebb átláthatóság érdekében a törzsfán csak a filospécieszek reprezentatív OTU-it vettük be. A TAG59-es törzs Rifaat és mtsai (2002) tenyésztéséből származik.

plazmidot (Ti plazmid) hordozó törzsei kétszikű növények gyökerén gyökérgolyvát okoz. Kórokozó képességét egyszikűek estében kétségesnek tartják. A *Xanthobacter flavus* fakultatív hidrogén-autotróf szervezet, a nemzetség tagjai nitrogén fixációra képesek. Ezt a fajt a rizs gyökeréről már több alkalommal leírták (Stubner és mtsai, 1998; Reding és mtsai, 1991), je-

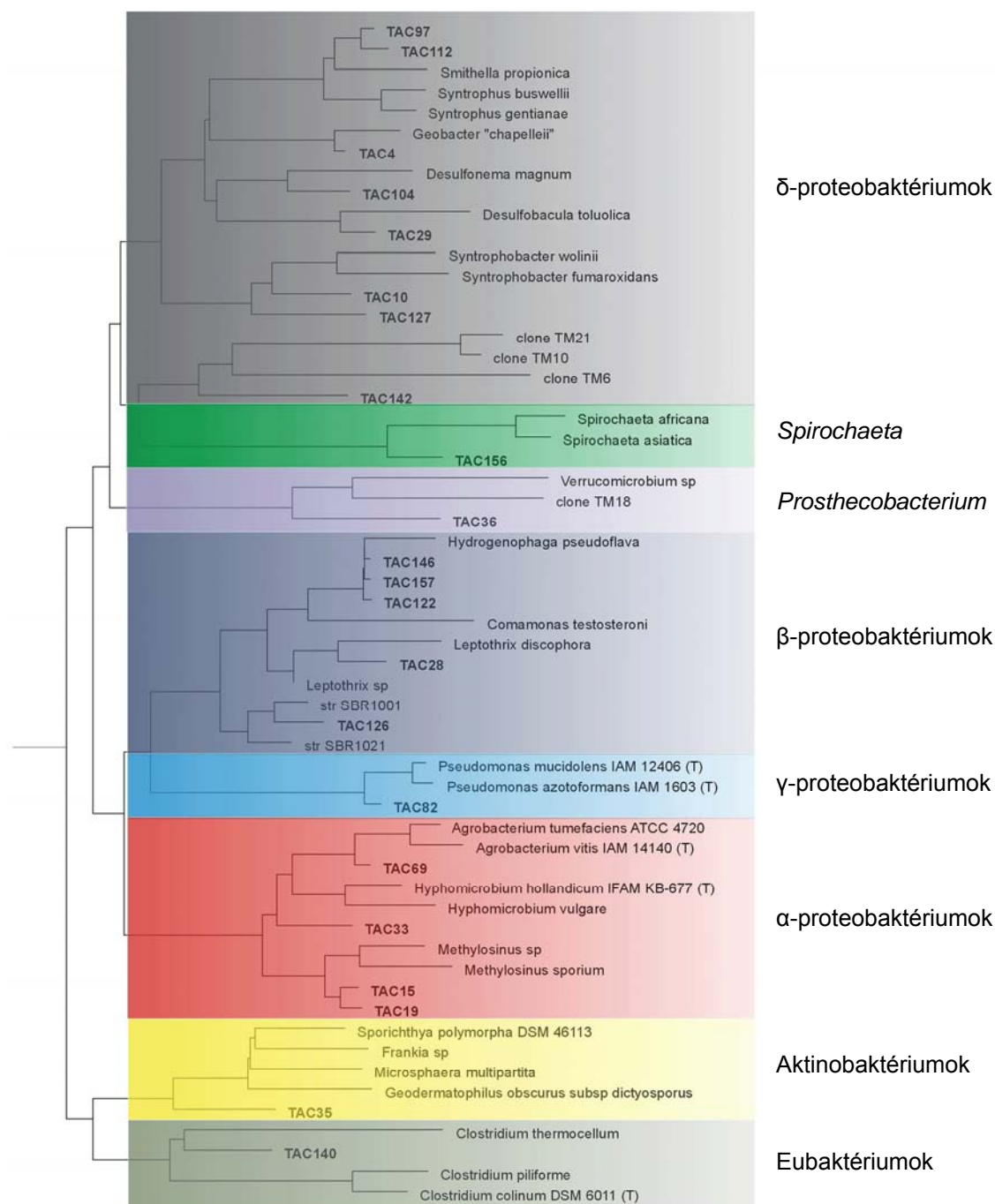
lenléte így a gyékény rizoplánban sem meglepő. Az *Enterobacteriaceae* családból az *Erwinia* spp., a *Citrobacter freundii* és a *Klebsiella planticola*, valamint egyes *Enterobacter* fajok régóta ismert növény-asszociált mikróbák. Mint endofiták a gyökérben, szárban, levelekben egyaránt előfordulhatnak. A növényre gyakorolt hatásuk a körülményektől függően lehet pozitív, semleges (Döbereiner, 1997; Baldani és mtsai, 1997; Rennie és mtsai, 1982), vagy, pl. az *Erwinia* esetében, patogén kapcsolat.

Megállapíthatjuk tehát, hogy az izolált fajok többsége az irodalmi adatok alapján tipikus rizobaktérium, közülük több faj növényi fejlődésre gyakorolt kedvező hatását igazolták. Az *Acinetobacter* és *Xanthobacter* fajok előfordulását eddig csak ún. hidrofiton (elárasztást tűrő) növényekről (pl. a gyékény és a rizs) írták le. Több általunk izolált baktérium (*Xanthobacter*, *Agrobacterium*, *Klebsiella*) potenciális nitrogénfixáló. E tulajdonságuk révén a relatíve nitrogénszegény lápi környezetben élő keskenylevelű gyékény nitrogénellátásában kulcsszerepet játszhatnak. Ezt az elképzelést Halbritter (2005) vizsgálatai alátámasztják, aki *T. angustifolia* gyökérén (in situ) nitrogén fixációs aktivitást mutatott ki.

A növény és baktériumai kapcsolatát a növényi stressz élettan oldaláról szemlélve még egy érdekes összefüggésre derül fény. Közismert, hogy a talaj oxigéntartalmának (víztelítettség okozta) csökkenésére adott növényi válasz (aerenhima kialakulása) etilén szignállal indul. Az általunk kimutatott baktériumok egy része (*Agrobacterium*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* fajok) képes etilén bioszintézisre (Primrose, 1976). Nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy az oxigéntartalom csökkenésével beinduló bakteriális etilénszintézis -a növény saját etilén produkciója mellett - kumulatív módon hozzájárulhat a növényi válaszreakció beindulásához.

A tenyésztési diverzitásvizsgálat eredményét összevetettük a nemtenyésztési, teljes DNS, ill. RNS izolálás és 16S rRNS alapú diverzitás elemzéssel. A késő ősszel (november) vett rizoplán minta vizsgálati eredményét a 28. ábrán mutatjuk be, míg a három évvel később kora nyáron (június) és ősz elején (szeptember) történt mintaelemzés során kimutatott genospécieszeket a 11. és 12. táblázatban összegezzük. Vagyis három különböző mintán végeztünk 16S rDNS (teljes DNS izolálás) alapú diverzitás elemzést. Ezek mellett az utóbbi két időpontban elvégeztük a 16S rRNS (teljes RNS izolálás) alapú rizoplán baktériumközösség vizsgálatot is.

Vegyük először szemügyre a mennyiségi adatokat. A klónok pontos mennyiségi eloszlását azon mintákra közöljük, ahol összehasonlításként az RNS alapú klónok vizsgálati eredménye is rendelkezésre áll (11. és 12. táblázat). A mennyiségi adatokat annak tudatában



28. ábra. A gyékény rizoplán teljes DNS kivonáson és 16S rDNS klónozáson és bázissorrend elemzésen alapuló vizsgálatában nyert filospécieszek törzsfája (Pfu polimeráz, TA klónozás). Késő őszi (november) minta. A fa neighbour joining módszerrel készült, a méretvonal 10 % nukleotid különbséget jelöl. A fa gyökerének a *Deinococcus radioresistens*-t választottuk (nem tüntettük fel).

kell azonban értelmezni, hogy a használt vizsgálati módszer több pontja - hasonlóképpen a tenyésztéses eljáráshoz - szelektív. Ezért a kapott adatokból nem lehet a tényleges gyakoriságokat, arányokat megállapítani. A rendre 135, 133, ill. 115 db. DNS alapú klón 52, 68, ill. 63 %-

a kloroplasztisznak bizonyult! A kloroplasztisz klónok (domináns) megjelenését nem lehetett kizárni, hiszen a kloroplasztisz inaktív formában, mint leukoplasztisz, nagy mennyiségben jelen van a gyökérben. A DNS extrakció során a plasztisz DNS-t is izoláltuk, amihez a vizsgálat során használt univerzális primerek nagy affinitással kötődtek. Ezzel magyarázható a prokarióta eredetű sejtorganellum domináns jelenléte a klónkönyvtárakban. A rizoplán DNS-alapú mikrobiális diverzitásával foglalkozó kutatók rendszerint szembesülnek ezzel a problémával (Normander és Prosser, 2000; Yang és Crowley, 2000).

Ennek tükrében Marilley és munkatársai rizoplán diverzitás vizsgálata (*Lolium perenne* és *Trifolium repens* esetében) erős kritikára szorul (1998). Gyökér által nem befolyásolt talajt, rizoszférát és rizoplánt hasonlítottak össze. A mintákból izolált DNS-ből amplifikálták a 16S RNS gént, klónozták a PCR terméket, majd a klónokat restrikciós analízisnek vetették alá. A klónokat hasítási mintázat alapján csoportosították, majd a csoportok számából diverzitási indexet kalkuláltak, de bázissorrend elemzést nem végeztek. Azt kapták, hogy a rizoplánban a diverzitás csökken, és néhány faj válik dominánssá. Valószínűleg a dominanciát ott is a kloroplasztisz képviseli (amelynek a restrikciós mintázata ráadásul nem homogén). Munkájuk másik hibája, hogy mintánként nagyon kevés klónt (29 db) vizsgáltak meg. A mintavételi hiba következtében egy-két mintázat dominanciája esetén jóval alulbecslik a tényleges diverzitást.

Érdekes viszont, hogy a kloroplasztisz klónok aránya jóval kisebb az RNS-alapú klónkönyvtárakban (1, ill. 7 %). Ha figyelembe vesszük, hogy az RNS-alapú megközelítés a baktériumközösség aktív tagjait mutatja ki, ez nem is annyira meglepő. A kloroplasztisz a gyökérben inaktív formában van jelen, szerepe inkább raktározásra korlátozódik. Feltételezhetjük, hogy egy aktívan fotoszintetizáló levélszövet kloroplasztiszaihoz viszonyítva jóval kevesebb riboszómát tartalmaznak. Ezek számaránya a gyökérben az aktív anyagcserét folytató baktériumokéhoz képest elenyésző lehet. Csupán két (ráadásul eltérő) év adatsorából nem lehet messzemenő következtéseket levonni a szezonális dinamikával kapcsolatban, ám nem árt megjegyezni, hogy az őszi RNS klónkönyvtárban megnőtt a kloroplasztisz klónok száma a nyári mintához képest. Mivel a raktározás a gyékényben a vegetációs periódus végén válik fontossá, a leukoplasztiszok szerepe és aktivitása is megnővekedhet ekkor. Mitokondrium rDNS szekvenciákat csak a nyári DNS mintából mutattunk ki elenyésző mennyiségben, amit a primerek mitokondriális rDNS-el szemben mutatott kisebb affinitásával magyarázhatunk.

A kloroplasztisz szekvenciáktól eltekintve a DNS-alapú klónkönyvtárakban a δ -proteobaktérium alosztályba tartozó, kénkörforgalomban résztvevő fajok dominánsak. Novemberben a *Synthrophobacter* (TAC10, TAC127), *Desulfonema* (TAC104), *Desulfobacula*

ARDRA csoport	Klónok száma	Közel rokon taxon és filogenetikai besorolása	Hasonlóság
<u>DNS minta (nyár)</u>			
DTA1	91 (68,42 %)	<i>Oryza sativa</i> kloroplasztisz	98 %
DTA2	2 (1,50 %)	<i>Triticum aestivum</i> mitokondrium	99 %
DTA3	3 (2,26 %)	<i>Zoogloea ramigera</i> , β -Proteobacterium	97 %
DTA4	2 (1,50 %)	<i>Thiobacillus denitrificans</i> , β -Proteobacterium	96 %
DTA5	1 (0,75 %)	<i>Rhodospirillum rubrum</i> , β -Proteobacterium	96 %
DTA6	1 (0,75 %)	<i>Burkholderia cepacia</i> , β -Proteobacterium	92 %
DTA7	5 (3,76 %)	<i>Desulforhopalus singaporensis</i> , δ -Proteobacterium	94 %
DTA8	4 (3,02 %)	Környezeti klón, δ -Proteobacterium	97 %
DTA9	4 (3,02 %)	Nem tenyésztethető szulfát-redukáló, δ -Proteobacterium	97 %
DTA10	2 (1,50 %)	<i>Desulfocapsa sulfexigens</i> , δ -Proteobacterium	92 %
DTA11	1 (0,75 %)	<i>Olavius algarvensis</i> , δ -Proteobacterium	90 %
DTA12	1 (0,75 %)	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> , δ -Proteobacterium	94 %
DTA13	1 (0,75 %)	Környezeti klón, δ -Proteobacterium	94 %
DTA14	1 (0,75 %)	<i>Geobacter</i> sp., δ -Proteobacterium	90 %
DTA15	1 (0,75 %)	<i>Cellulomonas fermentans</i> , Actinobacteria	94 %
DTA16	2 (1,50 %)	<i>Nitrospira</i> sp. klón, <i>Nitrospira</i> -csoport	96 %
DTA17	1 (0,75 %)	<i>Fusibacter paucivorans</i> , <i>Bacillus</i> / <i>Clostridium</i> -csoport	91 %
DTA18	5 (3,76 %)	<i>Cytophaga</i> sp., CFB-csoport	90 %
DTA kiméra	5 (3,76 %)		
$\Sigma 133$ (100,00 %)			
<u>DNS minta (ősz)</u>			
DTB1	72 (62,61 %)	<i>Oryza sativa</i> kloroplasztisz	98 %
DTB2	5 (4,35 %)	<i>Methylosinus trichosporium</i> , α -Proteobacterium	100 %
DTB3	1 (0,87 %)	<i>Rhodocyclidium vanniellii</i> , α -Proteobacterium	93 %
DTB4	4 (3,47 %)	<i>Rhizobium giardinii</i> , α -Proteobacterium	97 %
DTB5	1 (0,87 %)	<i>Leptothrix cholodnii</i> , β -Proteobacterium	96 %
DTB6	3 (2,61 %)	<i>Sterolibacterium denitrificans</i> , β -Proteobacterium	93 %
DTB7	5 (4,35 %)	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> , β -Proteobacterium	98 %
DTB8	1 (0,87 %)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , γ -Proteobacterium	98 %
DTB9	3 (2,61 %)	<i>Geobacter chapellei</i> , δ -Proteobacterium	95 %
DTB10	7 (6,08 %)	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> , δ -Proteobacterium	90 %
DTB11	1 (0,87 %)	<i>Desulfobacter postgatei</i> , δ -Proteobacterium	93 %
DTB12	3 (2,61 %)	<i>Smithella propionica</i> , δ -Proteobacterium	92 %
DTB13	2 (1,74 %)	<i>Desulfobacterium indolicum</i> , δ -Proteobacterium	90 %
DTB14	1 (0,87 %)	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> , δ -Proteobacterium	91 %
DTB15	1 (0,87 %)	<i>Frankia</i> sp., Actinobacteria	86 %
DTB16	1 (0,87 %)	<i>Verrucomicrobium</i> sp., Verrucomicrobiales	98 %
DTB17	1 (0,87 %)	<i>Clostridium thermocellum</i> , <i>Bacillus</i> / <i>Clostridium</i> -csoport	86 %
DTB18	3 (2,61 %)	<i>Spirochaeta americana</i> , <i>Spirochaeta</i>	92 %
$\Sigma 115$ (100,00 %)			

11. táblázat. A gyékény rizoplán teljes DNS kivonáson és 16S rDNS klónozáson és bázissorrend elemzésen alapuló vizsgálatában nyert filospécieszek (Taq polimeráz, tompa végű klónozás). Júniusi és szeptemberi minták. A közel rokon taxonok keresését az NCBI nukleinsav adatbázisában a BLAST program segítségével valósítottuk meg.

(TAC29), *Desulfovibrio* (TAC142) rokonsági kör tagjai jellemzők. A másik két minta esetén a DTA7, DTA9, és a DTA10 a *Desulforhopalus singaporensis* és *Desulfocapsa sulfexigens*,

míg a DTA11 az *Olavius algarvensis* rokonsági körébe tartozik. A DTB13 egy *Desulfobacterium* sp., a DTB11 egy *Desulfobacter* sp. 16S rDNS szekvenciáival mutat szorosabb kapcsolatot. A *Synthrophobacter* génusszal rokonságot mutató DTB10 különálló leszármazási vonalnak tekinthető. A TAC142 és a DTB14 legközelebbi rokonai tőzeglápból származó környezeti klónok, a *Desulfovibrio vulgaris* a legközelebb álló tenyésztendő faj, de csak nagyon kis hasonlósági szinten. A TAC142 teljesen különálló ágnak bizonyult. Érdekes módon legközelebbi rokonai szintén környezeti klónok, amelyek hasonló környezetből, a gifthorni (Németország) tőzeglápból származnak (TM6, TM10 és TM21) (Rheims és mtsai, 1996).

A néhány esetben kis bázissorrend hasonlóság értékek ellenére feltételezhetjük, hogy egyes klónok szulfátredukálásban résztvevő fajokat képviselnek. Habár az SRB nem alkot filogenetikailag koherens taxonómiai csoportot, hasonló ökológiai szerepük miatt célszerű őket együtt tárgyalni. Tipikus (obligát) anaerób fajok. A szulfátredukáláshoz elektrondonorként H_2 -t, alkoholokat, zsírsavakat, egyéb monokarbonsavakat, dikarbonsavakat, néhány aminosavat, szénhidrátokat, aromás vegyületet használhatnak. Jellemző élőhelyük a vizek anaerób vízteste és az üledékek, talajok. Többször aerób környezetből is izolálták őket, ahol vagy nyugvó állapotban lehettek jelen (Cypionka és mtsai, 1985), vagy anaerób mikrokörnyezetekben aktív anyagcserét folytathatnak (Jorgensen, 1977). Habár a rizoplánt alapvetően aeróbnak tekinti a szakirodalom, nem szabad elfeledkezni arról, hogy az oxigén kiáramlása a nappali fotoszintézishez köthető, éjszaka viszont anaerób körülmények alakulhatnak ki (Nikolausz és mtsai, 2008). Wind és munkatársainak (1999) vizsgálatai rizs gyökerén szulfátredukálók aktív anyagcseréjét igazolták, ráadásul a szulfátredukációs aktivitás és a szulfátredukáló baktériumok száma a rizzzel beültetett területeken jóval nagyobb volt, mint a növényzet nélküli kontroll talajon (Wind és Konrad, 1997). A gyökérkörzetben megnövekedett aktivitás nagy valószínűséggel a kénoxidáló baktériumok (pl. *Beggiatoa* spp.) által közvetített szulfid oxidációnak köszönhető, amely "visszagenerálja" a szulfátredukálók légzési szubsztrátját. Annak kiderítése, hogy ez napszakos rendszerben, vagy helyi sejt-sejt kapcsolaton alapuló kénforgalomban zajlik, még várat magára. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy néhány szulfátredukáló szervezet (*Desulfobulbus*, *Desulfobacula*, *Desulfonema*) képes aerób körülmények között aktív anyagcserére, ráadásul a kénhidrogén oxidálására is (Fuseler és Cypionka, 1995; Krekeler és Cypionka, 1995). A szulfátredukálók jelenlétét a gyékény, ill. a nád gyökerén egyébként tenyésztéssel is igazoltuk (Zöld-Balogh, 1999; Vladár és mtsai, 2004; Vladár és mtsai, 2008).

A keletkezett redukált kénvegyületek toxikusak lehetnek a növény számára. Ezek méregtelenítésében kénoxidáló baktériumok vehetnek részt. A DTA4 közeli rokona a

Thiobacillus denitrificans-nak, amely képes redukált kénvegyületek oxidálására. Az őszi mintákból kimutatott DTB3 és TAC33 a *Hyphomicrobium*, *Rhodomicrobium* génuszok rokonsági körébe tartozik. A nemzetség tagjai vízi környezetekben dominánsak, főként élőbevonatokban, vízi-növények felületén kialakuló biofilmekben gyakoriak. Bizonyos körülmények között képesek redukált kénvegyületeket, főként dimetil-szulfoxidot és dimetil-szulfidot oxidálni (elsősorban aminosav lebontási anyagcseretermékek). Mind a *Hyphomicrobium*, mind a *Thiobacillus* génusz tagjai esetén feljegyeztek denitrifikációs aktivitást.

Másik példa a mérgező vegyületek oxidálására a TAC15, TAC19, DTB2 klónok által képviselt szervezetek jelenléte. E csoport tagjait *Methylosinus (trichosporium)*-nak azonosítottuk. A génusz tagjai terminális elektronakceptorként oxigént használva metánt oxidálnak (metanotróf aerób légzők). A metán termelődésének színhelye valószínűleg az anaerób átalaj, bár az időszakosan anaeróbbá váló rizoszféra - rizoplán is szerepet játszhat benne. A rizs gyökeréhez kötött metánoxidációt már több alkalommal is igazolták (van der Gon és Neue, 1996; Watanabe és Furusaka, 1980), a termelődött metán 10 - 80 %-a oxidálódhat így (King, 1994). Hasonlóan a kénkörforgalmi ciklushoz, legfontosabb tényező az oxigén ellátottság, melyben döntő szerep jut a növények gyökerének (Calhoun és King, 1997).

Közvetve hidrogén autotrófok (pl. metanogének) jelenlétére utalnak a *Syntrophus* - *Smithella* csoportba tartozó klónok (TAC97, TAC112, DTB12). A csoport energetikai anyagcseréjéhez ugyanis obligát módon szükséges hidrogén-fogyasztó szervezetek egyidejű jelenléte (Mountfort és mtsai, 1984). Ezek lehetnek metanogének, de jó H_2 fogyasztók a már említett *Desulfovibrio* és *Hydrogenophaga* génuszba tartozó fajok is.

A TAC4, DTA14 és a DTB9 legközelebbi rokonai *Geobacter* fajok. A *Geobacteriaceae* családba tartozó szervezetek "üledéklakó", vaslégző baktériumok. Coates és munkatársainak vizsgálatai alapján azonban úgy tűnik, hogy természetes környezetben az elsődleges terminális elektronakceptorok a huminsavak lehetnek, melyek visszaoxidálódva, abiotikus úton redukálják a Fe^{3+} ionokat (Coates és mtsai, 1998). A redukált Fe^{2+} ionok visszaoxidálására képes *Leptothrix* nemzetség tagjaival mutat közeli rokonságot a TAC28 és DTB5 bázissorrendje. *Leptothrix*-szerű szervezetek jelenlétét több alkalommal kimutatták vízzel elárasztott talajban gyökerező növények gyökérszónájában (Emerson és mtsai, 1999; King és Garey, 1999). A Fe^{2+} ionok nagy mennyiségben toxikusak lehetnek a növény számára (ilyen koncentrációk nem alakulnak ki a rizoszférában). A vasoxidáló baktériumoknak a vas immobilizációja mellett a vaslégzőkkel alkotott lokális vaskörforgalom révén, a növény folyamatos vasellátásában lehet szerepük.

Érdekes a *Frankiaceae* családba tartozó TAC35 és DTB15 klónok jelenléte. Viszonylag kis bázissorrend hasonlóság értéket kaptunk a *Frankia* génusszal, aminek az oka egy nagyméretű inzerció az első (5') variábilis hurokban, ami nehézkessé tette az illesztést. A maradék részre vonatkozó hasonlósági számítások a *Frankia* nemzetségbe sorolást valószínűsítik. A frankiák nitrogénfixáló, aktinorizás gyökérgumó képző aerób szervezetek. Aktivitásukat ebben a növény rokonsági körben még nem írták le. Többször izoláltak *Frankia* fajokat olyan talajból, ahol a gazdanövény hiányzott (Houwers és Akkermans, 1981; Smolander és Sundman, 1987) és ilyen esetekben akár más -nem gazda - növényt parazitáltak. Szerepüket érdemes lenne tisztázni.

A DTB7, TAC146, TAC157, és TAC122 klónokkal képviselt ARDRA csoportok tagjai 98 % feletti bázissorrend hasonlóság mellett a β -proteobaktérium alosztályba tartozó *Hydrogenophaga pseudoflava* fajjal lehetnek azonosak. A *Hydrogenophaga* nemzetség tagjai tág biokémiai spektrummal jellemezhetők. Néhány törzs nitrogént fixál (Jenny és mtsai, 1989), míg másokra a denitrifikáció jellemző, redukált kénvegyületek oxidálása mellett (Aragno és Schlegel, 1999). Fakultatív hidrogénfogyasztásuk, amiről a génusz a nevét kapta, szintróf kapcsolatok létrehozására is képessé teszi őket (Feigel és Knackmuss, 1993). Habár a DTB4 klónokat a BLAST a *Rhizobium* nemzetségbe sorolta, pontosabb illesztés alapján (ARB) inkább egy *Agrobacterium* szekvenciának tekinthető. Az *Agrobacterium*-ok lápi növények gyökerén közönségesek lehetnek, ezt támasztja alá, hogy jelenlétüket tenyésztéssel is kimutattuk, valamint Micsinai és munkatársai (2003) is izoláltak *Agrobacterium* törzseket nád gyökeréről. Halbritter gyékény gyökeréről N-mentes táptalajon dúsított majd izolált baktériumokat, ezek egy része *Agrobacterium tumefaciens*-nek bizonyult (Halbritter, 2005). Habár az *Agrobacterium*-okat, mint (kétszikű) növényi kórokozókat tartjuk számon, lápi (egyszikű) növények gyökerén a szerepük sokkal inkább a nitrogén-körforgalomban lehet fontos nitrogénfixálás révén (Eady, 2001).

A TAC82 és a DTB8 közeli rokona a *Pseudomonas mucidolens*, *Ps. fluorescens* rokonsági körnek. Habár nagy bázissorrend hasonlósági értéket kaptunk (98.7 %), a faji besorolás mégsem lehetséges, mivel a *Pseudomonas*-ok között nagy 16S rDNS hasonlósági értékekhez kis genomszintű hasonlóságok (DNS - DNS hibridizáció alapján) párosulnak. A *Pseudomonas*-ok megjelenésére a rizoplánban irodalmi adatok alapján számítani lehet (Palleroni, 1992). Az ún. fluoreszcens pszeudomonasz csoport sok tagját tipikus gyökér aszszociált, növényi növekedést serkentő (PGPR) baktériumokként tartják nyilván. A növényi növekedést serkentő hatásukban szerepet játszhat denitrifikáló aktivitásuk (nitrogén egyensúly), valamint antagonista hatásuk a növénypatogénekre a (pl. sziderofór termeléssel létreho-

zott vaslimitáció révén; Kloepper és mtsai, 1980). Szintén a *Pseudomonadaceae* családba tartozik, ám inkább a *Zoogloea* génuszba sorolható a DTA3 klón. Habár a génusz típusfaját, a *Zoogloea ramigera*-t, leginkább az eleveniszapos szennyvíztisztítás kapcsán vizsgálták, tipikus vízi szervezet, melyre nagyon aktív oxidatív anyagcsere és a lebontható szerves anyagok széles spektruma jellemző (Palleroni, 1992).

A DTA6 a β -proteobaktériumok alosztályán belül a *Burkholderia cepacia*-val mutat közelebbi rokonságot. A *Burkholderia* génusz tagjai tipikus talajlakók, leginkább növényi gyökérhez asszociáltak, vagy nedves, elárasztott talajokban jellemzők (Woods és Sokol, 2000). A *Pseudomonas*-okhoz hasonlóan több fajánál komoly növényi növekedést serkentő kapacitást mutattak ki (Govan és mtsai, 1996).

A DTA16 legközelebbi rokona egy *Nitrospira* rokonsági körbe tartozó környezeti klón. A denitrifikáló és N_2 kötő szervezetek mellett a nitrifikálóknak is fontos szerep juthat, teljessé téve a lokális nitrogén-körforgalmat. Szerepüket a gyökérszónában nem tartották jelentősnek. Mára több kutatás is igazolta jelenlétüket (Bodelier és mtsai, 1996) és jelentős nitrifikáló aktivitásukat (Arth és Frenzel, 2000; Nikolausz és mtsai, 2008). Ha figyelembe vesszük, hogy a kemolitotróf nitrifikáló baktériumok tenyésztését nyomnyi mennyiségű szerves anyag is gátolhatja, ez a változás nem meglepő.

A *Prostheco bacterium* csoport reprezentánsa a TAC36 és a DTB16, ami a *Verrucomicrobium* nemzetség rokonsági körébe tartozik. Ide tartozik továbbá a TM18 jelű, szintén a gifhorni tőzeglápból származó környezeti klón is. A DTB17 és TAC140 egy *Clostridium* nemzetségbe tartozó fajt reprezentál. Cellulolitikus enzimek jelenléte a nemzetségen belül általános, ezért természetes környezetekben fontos szerepük van a cellulóz degradálásában. Szintén cellulóz lebontására utal a DTA15 klón, amely a *Cellulomonas fermentans*-szal mutat rokonságot. Míg a *Clostridium* fajok összességében (anaeróbok), a *Cellulomonas*-ok nyárelőn jellegzetesek (aeróbok). A DTB18 és TAC156 *Spirochaeta* rokonsági körbe sorolható. A *Spirochaeta* génusz tagjai különböző szénhidrátokat képesek fermentálni. Hiányzik azonban esetükben a cellulóz-, és pektin lebontásának képessége. Olyan helyeken, ahol nagy mennyiségben található növényi szerves anyag, más fajok által depolimerizált szénhidrátokat fermentálnak. Fontos szerepük lehet a cellulóz közösségi lebontásának végső stádiumában a keletkezett intermedierek eltávolításával, a végtermék gátlás megakadályozásában.

Ha az RNS-alapú megközelítéssel kapott csoportok rokonsági viszonyait áttekintjük (12. táblázat), a kloroplasztisz klónok jóval kisebb aránya mellett a restriktív mintázati csoportok száma is jóval kevesebb. Ez kisebb kimutatható faji diverzitásra utal. Szembeötlő,

hogy a klónokhoz közel rokon taxonok között minden esetben könnyen tenyésztethető fajokat kaptunk nagy hasonlósági értékek mellett (98 - 99 %), míg több DNS-alapú csoport legközelebbi rokonai környezeti klónok.

A nyári mintát az RTA6 ARDRA csoport 95 %-os dominanciája jellemzi. Habár a mintázati csoport reprezentatív bázissorrendjei rendre 99 %-os hasonlóságot mutattak a fluoreszcens pszeudomonaszok közé tartozó *Pseudomonas brennerii*-vel, a pontos faji szintű besorolás kérdéses. A DNS-alapon is kimutatott *Pseudomonas*-ok nagyon jól tudják hasznosítani a növény által kibocsátott gyökérexudátum szénhidrátjait oxigénnel, vagy nitráttal megvalósított légzés során. Mivel sok kópiában tartalmazzák a riboszómális operont, kedvező körülmények közé kerülve nagyon aktív anyagcserét képesek folytatni nagy sejtenkénti riboszóma számmal. Elképzelhető, hogy a *Pseudomonas*-ok nagyon aktív anyagcseréjük révén a rizoplán összes riboszómáinak döntő többségét adják, sejtszámuk aránya mégsem jelentős. Az őszi minta RTB2 klónját szintén a *Pseudomonas* génuszba sorolhatjuk, ám ebben a mintában a számarányuk már nem olyan jelentős. Nehéz azonban megválaszolni, hogy a DNS-alapú klónkönyvtárakban miért csak kis százalékbán található *Pseudomonas* szekvencia?

ARDRA csoport	Klónok száma	Közel rokon taxon és filogenetikai besorolása	Hasonlóság
<u>RNS minta (nyár)</u>			
RTA6	98 (95,15 %)	<i>Pseudomonas brennerii</i> , γ -Proteobacterium	99 %
RTA108	3 (2,91 %)	<i>Serratia proteomaculans</i> , γ -Proteobacterium	98 %
RTA131	1 (0,97 %)	<i>Photobacterium phosphoreum</i> , γ -Proteobacterium	98 %
RTA39	1 (0,97 %)	<i>Oryza sativa</i> kloroplasztisz	98 %
$\Sigma 103$ (100,00 %)			
<u>RNS minta (ősz)</u>			
RTB1	77 (60,16 %)	<i>Delftia (Comamonas) acidovorans</i> , β -Proteobacterium	99 %
RTB26	2 (1,56 %)	<i>Alcaligenes faecalis</i> , β -Proteobacterium	96 %
RTB2	18 (14,06 %)	<i>Pseudomonas putida</i> , γ -Proteobacterium	98 %
RTB7	12 (9,38 %)	<i>Serratia proteomaculans</i> , γ -Proteobacterium	98 %
RTB28	2 (1,56 %)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> , γ -Proteobacterium	98 %
RTB56	3 (2,34 %)	<i>Nocardioides simplex</i> , Actinobacteria	99 %
RTB14	9 (7,03 %)	<i>Oryza sativa</i> kloroplasztisz	98 %
RTB kiméra	5 (3,91 %)		
$\Sigma 128$ (100,00 %)			

12. táblázat. A gyékény rizoplán teljes RNS kivonáson alapuló diverzitáselemzése során nyert filospécieszek. Júniusi és szeptemberi minták. A legközelebbi rokon taxonokat az NCBI nukleinsav adatbázisában BLAST keresőprogram segítségével állapítottuk meg.

A lehetséges válasz a kétféle metodika különbségéből adódhat. A nemtenyésztéses vizsgálatok torzításaival az irodalmi áttekintésben már foglalkoztunk. Az RT-PCR legjelentősebb lehetséges torzítását a kis (42 °C) hőmérsékleten végrehajtott reverz transzkripció okoz-

hatja. A nem teljesen denaturálódott 16S rRNS másodlagos szerkezeti elemek befolyásolhatják az átírást.

Az RTA108 és RTB7 a *Serratia proteomaculans*-szal mutat szoros rokonságot. A nemzetség tagjait elsősorban humán vonatkozásban szokták tárgyalni, mint opportunistá patogéneket (Grimont és Grimont, 2000), vizekben, talajban, üledékben, növényekhez asszociáltan közönséges az előfordulásuk (Grimont és mtsai, 1981). Lalande és munkatársai kukorica gyökeréről izolált baktériumok növényi növekedést serkentő hatását vizsgálták (1989). Azt találták, hogy az izolált törzsek döntő többsége *Pseudomonas* volt, mégis a növekedést leginkább egy *Serratia* izolátum serkentette.

Az őszi mintára a *Delftia (Comamonas) acidovorans* (RTB1) dominanciája jellemző. A *Comamonas* génusz tagjai szintén szigorú aerób, nem fermentáló kemoorganotróf baktériumok. Talajban, vizekben, aerób üledékben előfordulásuk természetes. Biodegradációs kapacitásuk nagy, ezért az ásványosításban lehet fontos szerepük (Willems és mtsai, 2000). Szintén a β -proteobaktériumok közé sorolhatjuk az RTB26 ARDRA csoportot, amely az *Alcaligenes faecalis* rokonsági körébe sorolható. A nemzetségbe tartozó fajok tipikus tagjai a rizoszférának. Van Outryve és munkatársai (1988) cikória (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) rizoszféra baktériumközösségét vizsgálva, a fluoreszcens pszeudomonaszok mellett *Alcaligenes paradoxus* alkotta az izolált törzsek dominanciáját kapta.

Az RTB28 98 %-os szinten az *Acinetobacter johnsonii*-hoz áll legközelebb. Ezen a ponton mindenképpen "meg kell állni egy pillanatra", hiszen ez az első olyan eset, amikor egy tenyésztéssel nyert domináns csoport tagjait meglettük a nemtenyésztéses eljárásokkal. Az őszi mintavétel esetén a gyökérkörzet egyik domináns tenyészthető tagja *Acinetobacter* volt, nyáron nem sikerült kimutatni. Az RNS-alapú vizsgálatok során is csak az őszi mintából tudunk kimutatni. A tenyésztéses és nem tenyésztéses technikákkal végzett rizoplán vizsgálatokban még egyezést mutatott az *Agrobacterium* és a *Pseudomonas* (Rifaat és mtsai, 2000) fajok jelenléte, bár ez utóbbiak a tenyésztéses elemzésben a véletlenszerűen izolálható kategóriába tartoztak.

DNS szinten vizsgálva a három minta alapvetően ugyanazokat a taxonokat és funkcionális csoportokat adta. A két mintavétel során, RNS szinten jóval nagyobb különbséget tapasztaltunk, ráadásul jóval kisebb faji diverzitást. Elgondolkodtató továbbá, hogy egyazon környezetben (sőt mintában) a különböző megközelítésekkel anaerób és szigorúan aerób szervezetek dominanciáját detektáltuk. A tenyésztett szervezetek nyilvánvalóan a módszerből fakadóan (fakultatív) aeróbok. A klónok jelentős része szulfátredukáló, de kénoxidálókra utaló szekvenciákat ugyanúgy kimutattunk. Vasoxidálók és vaslégzők (Fe^{3+} respiratórikus re-

dukálása), valamint nitrifikálók és denitrifikálók is kimutathatók DNS alapon egymás mellett. Az RNS alapon kimutatott mikrobák megint csak (fakultatív) aeróbok. A meglepőnek tűnő eredményre (a módszertani különbségek mellett) magyarázat lehet a mikrokörnyezeteket egybeolvasztó mintavétel. A gyökéren jelenlévő, és dinamikusan változó mikrohabitatok külön mintázása jelenleg megoldhatatlan. A PCR-rel felszaporított DNS ráadásul származhat inaktív sejtekből, de akár elpusztult sejtekből származó, polifenolos, humusz anyagok felületén hosszabb időre megkötött szabad DNS-ből is. Magyarázat lehet a fotoszintetikus aktivitás napszakai fluktuációja következtében beálló redox potenciál változás, minek következtében az aerób szervezetek nappal lehetnek aktívak, míg az anaeróbok aktivitása éjszaka válhat dominánssá. (Nikolausz és mtsai, 2008). Kappelmeyer és munkatársai egy mesterséges lápot modellező, egy *Juncus* fajjal beültetett modell reaktoron vizsgálták aerób és anaerób mikrobiológiai folyamatok párhuzamos meglétét, továbbá a redox potenciál jellegzetes napszakai oszcillációját mutatták ki (2002). Hasonló napszakai fluktuációt mutatnak cianobaktériumot vagy algákat tartalmazó biofilmeknél (Frund és Cohen, 1992). Érdekes kérdést vet fel, hogy vajon hogyan alkalmazkodnak a baktériumközösség tagjai a napszaken váltakozó redox viszonyokhoz? Nem lehet tudni, hogy a szigorúan anaerób mikroorganizmusok hogyan vészeli át a nappalt, hogyan védekeznek a reaktív oxigén-intermedierek (H_2O_2 , O_2^-) ellen? Ennek megvalósítása valószínűleg közösségi szinten folyik, bár néhány szigorúan anaerób baktérium termelhet katalázt és/vagy szuperoxid-diszmutázt.

Az RNS-alapú vizsgálatok során kizárólag aerób, heterotróf baktériumokat tudtunk kimutatni a tenyésztéshez hasonlóan. Ezek a szervezetek a növény által a gyökér környezetébe juttatott oxigénből és a változatos összetételű gyökérexudátumokból élhetnek. Habár az RNS-alapú megközelítés jóval kisebb diverzitást mutat, mindenképpen előnye, hogy a baktériumközösség aktív tagjait lehet vele kimutatni. Nem elhanyagolható az sem, hogy jóval nagyobb átfedést mutat a tenyészthető baktériumokkal, és a bázissorrend hasonlóságok is jóval nagyobbak, mint a DNS-alapú megközelítésnél. Feltételezhetően a szezonális dinamika követése is jóval alkalmasabb a DNS-alapú vizsgálatoknál.

A nemtenyésztési diverzitásvizsgálatok során kimutattuk H_2 termelő (szintróf) és metilotróf fajok jelenlétét, amely közvetve metanogének jelenlétét valószínűsíti a rizoplánban. A rizoplánból izolált DNS pozitív PCR terméket adott a metanogénekre kifejlesztett primerekkel. Mivel a primerpár a metanogének kívül néhány más taxont is kimutathat (Großkopf és mtsai, 1998a), ezt még nem tekinthetjük bizonyítéknak a metanogén baktériumok jelenlétére. A PCR termék összetételét egy klónozást követő bázissorrend elemzéssel pontosítottuk.

Mivel célunk inkább a metanogének jelenlétének az igazolása volt, csupán 25 klónt vizsgáltunk. Összesen 10 különböző ARDRA csoportot tudtunk elkülöníteni (13. táblázat). A vizsgált bázissorrendek legközelebbi rokonai, általában szintén környezeti klónok. A primerek, habár nem teljesen specifikusak, főként metanogén szervezetekből származó DNS-t amplifikáltak. A klónok jelentős része a *Methanosaeta* nemzetségbe sorolható, legközelebbi rokonuk a *Methanosaeta concilii*, míg az M12 csoport klónjait *Methanosaeta soehngenii*-nek azonosítottuk. A nemzetség tagjai acetátot használnak szubsztrátként. Szerepük olyan anaerób üledékekben lehet jelentős, ahol a rivális acetátot hasznosító baktériumok aktivitása korlátozott a kis szulfát és nitrát koncentrációk miatt (Eggen és mtsai, 1990). A lápok általában ilyenek.

Az M5 és M9 csoportok különböző hasonlósági szinteken közeli rokonai egy tőzegmohalápból származó *Methanospirillum* környezeti klónnak (Hales és mtsai, 1996). A nemzetség egyetlen axenikusan tenyészthető tagja a *Methanospirillum hungatei*. Jellemző rá, hogy elektron donorként hidrogént használ, de növekedési faktorként szintén acetátot igényel. A *Methanomicrobiaceae* családon belül nagy valószínűséggel szintén a spirillum csoport tagja az M8 ARDRA csoport. A *Methanomicrobium* nemzetségre szintén a H₂ hasznosítása jellemző a metanogenezis során.

ARDRA csoport	Klónok száma	Közel rokon taxon	Hasonlóság
M2	3 (12 %)	62-2 (klón)	99 %
M5	2 (8 %)	<i>Methanospirillum</i> sp. (klón)	96 %
M6	4 (16 %)	<i>Methanosaeta concilii</i>	98 %
M8	5 (20 %)	Val 47 (klón, Methanomicrobiaceae)	97 %
M9	1 (4 %)	<i>Methanospirillum</i> sp. (klón)	97 %
M10	4 (16 %)	62-2 (klón)	97 %
M11	1 (4 %)	GW70-10-49 (klón)	99 %
M12	2 (8 %)	<i>Methanosaeta (Methanothrix) soehngenii</i>	99 %
M15	2 (8 %)	pGrfB286 (klón, Crenarchaeota)	99 %
M24	1 (4 %)	pGrfC26 (klón, Crenarchaeota)	98 %
Σ25 (100 %)			

13. táblázat. A "metanogén taxon specifikus" 16S rDNS klónkönyvtár ARDRA csoportjainak legközelebbi rokon bázissorrendekkel mutatott hasonlóság értékei gyékény rizoplán mintából.

Az M10 és M12 klónok 97 és 99 %-os bázissorrend hasonlóság mellett egy szennyvíztisztító eleveniszapból DNS-alapon nyert klónnal (62-2) mutatnak szoros kapcsolatot, míg az M11 legközelebbi rokona mezőgazdasági talajból származó környezeti klón. Az eredmények-

ből világosan következik, hogy az időszakosan aeróbbá váló rizoplánban jelen vannak szigorúan anaerób metanogén baktériumok. A gyökérkörnyezetet, mivel részlegesen aeróbbá válik, sohasem tekintették a metanogenezis színterének, de kísérletek során, anaerób rendszerbe helyezték, levágott és mosott rizsgyökér azonnal elkezdett metánt termelni (Frenzel és Bosse, 1996). Großkopf és munkatársai (1998b) taxon specifikus 16S rDNS klónkönyvtárt vizsgálva *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, és *Methanosaeta* génuszok jelenlétét igazolták rizs gyökerén. Továbbá fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH) az élő metanogén sejtek pontos elhelyezkedését próbálták feltérképezni. Csak idősebb gyökereken, a gyökércsúctól távol tudtak gömb alakú, nagy riboszóma számú, aktív sejteket kimutatni. Feltételezhetjük, hogy a metanogén baktériumok, ha nem is domináns, de állandó tagjai a rizoszféra - rizoplán baktériumközösségnek lápi növényekben.

Összegezve a gyékény rizoplán vizsgálata során nyert tapasztalatainkat az első, amit meg kell állapítanunk, hogy a csíraszámlálás ebben az esetben - bár elvégezhető - nem ad értékelhető eredményt. 1 g-nyi gyökértömeg felülete mindig más és más, no meg azt sem tudjuk, hogy a mikrobák megoszlása a rizoplán és az endorizoszféra között milyen. Megjegyezzük még, hogy sok más olyan eset is van, amikor a csíraszámlálási adat nem hordoz, vagy nem hordoz értelmezhető információt. A második, amit meg kell jegyeznünk, hogy a nemtenyésztési eljárásokkal (a tenyésztéshez viszonyítva) két "másik diverzitást" fedeztünk fel, benne sok nem, vagy csak igen nehézkesen tenyésztethető genospéciesszel. A 60 körüli számban diszkutált különböző fajok (filospécieszek) (15 tenyésztett, 27 DNS klón, 10 RNS klón, 9 Archaea klón) között csupán kettő, vagy három akadt, amelyiket "mindhárom diverzitásban" megtaláltuk (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp.). Még ha az Archaea klónokat nem is vesszük számításba, kiábrándítónak tarthatnánk az eredményt. Rögtön felmerül a kérdés, hogy nem a hibás mintavétel okozta-e ezt a különbséget? A válasz két okból is nem. Az egyik a "szabványosított" mintavétel (Nikolausz és mtsai, 2004), a másik pedig, hogy volt olyan mintánk is, amelyet párhuzamosan elemeztünk mindhárom eljárással. Hozzátehetjük még, hogy párhuzamos és későbbi célzott vizsgálatok gyékény és nád rizoplánon egyes további fajok, fajcsoportok jelenlétét igazolták (Rifaat és mtsai, 2000; Micsinai és mtsai, 2003; Vladár és mtsai, 2008; stb.). Vagyis az anaerób általajba ágyazott aerób endorizoszféra / rizoplán mikrobiótának egy sokkal valóságosabb képét ismerhettük fel, benne a közösségi anyagcsere sok egymásra épülő, egymást kiegészítő szintjével. A komplex szerves anyagok aerób lebomlásától egészen a H₂ termelő végső lépésekig, vagy a metanogenezistől a metanotrófiáig. A C körforgalom mellett kimutattuk a lokális S, N, Fe

körforgalomban résztvevő baktériumokat is, amelyeket pedig ilyen gazdagságban a tenyésztéses eljárásokkal csak évtizedek szorgos kutató munkájával tárhattuk volna fel.

Ennek ellenére a tenyésztéses, ill. a DNS és RNS alapú "három diverzitás" a valóságos közösségi folyamatok töredékét tárta fel. Egy komplex, az elemkörforgalmak egymásba ágyazott funkcionális képe további célzott tenyésztéses és molekuláris elemzések sokaságával lesz csak nagy mélységben megismerhető (pl. *Pseudomonas* tenyésztés, *Bacillus* FISH). Hangsúlyozzuk a "polifázikus" megközelítés fontosságát, hiszen a nem tenyésztett filospécieszek szerepének megismerése, specifikus enzimátikus képességeik feltárása egyelőre csak tenyészetek vizsgálata alapján képzelhető el. A továbblépésnek, vagyis a közösség összetétele, működése megismerésében való előrelépésnek az előbb említett megközelítéseken túl lényeges eleme a gyakori - az évszakos mintavételnél feltétlen gyakrabban - mintavétel. Ha végig akarjuk követni a növény fenofázisának szakaszait, vagy napszakos mintavételt tervezünk mind a tenyésztéses, mind pedig a klónozáson alapuló filospéciesz azonosítás technikája megoldhatatlan feladat elé állítja a kutatót. A megoldást az ujjlenyomat eljárások alkalmazása jelentheti.

Feltétlenül fel kell hívni a figyelmet arra is, hogy vizsgálataink során a molekuláris technikák hibáinak és korlátainak sorozatával is szembesültünk. Ezek részletes elemzésére, sőt még bemutatására sincsen mód (a későbbiekben ennek a munkának néhány eredményét közöljük), de felsorolásszerűen egy-két egyszerűbbet említek. Rá kellett döbbernünk, hogy nem mindegy milyen márkájú Taq polimeráz enzimet használunk, nem szabad PCR berendezést "váltani" munka közben, de még a PCR "Eppendorf cső" sarzs is azonos kell legyen, a "gyári" kompetens sejtek nem veszik fel a plazmidot...

V.3. A molekuláris ujjlenyomat eljárások haszna az alkalmazott bakteriológiában

Az alkalmazott mikrobiológiai vizsgálatok legnagyobb kihívása a gyakori mintavételi igény. A hagyományos tenyésztéses megközelítéssel ilyen esetekben szelektív és differenciáló táptalajok felhasználásával csíraszámok meghatározása a követhető eljárás. A gyakorta ismeretlen mikrobiótájú közegek esetén azonban a "szabványos" táptalajok alkalmazása kétes hasznú, hiszen nem tudjuk, hogy a tápközegnek "milyen diverzitásból kellene válogatnia". Másrészt pedig továbbra is gondot jelent az illető közegben aktív, de mégsem tenyészthető szervezetek köre. Vagyis olyan módszert kellene alkalmazni, amelyik nem szelektív és nagy mélységben bemutatja a kérdéses közeg mikróbaközösségének tagjait. Lehet, hogy ilyen eljárást ma még nem ismerünk, mégis ilyen esetekben lehet hasznunkra a molekuláris ujjlenyomat eljárások köre. Aránylag gyors és gazdaságos módszerek, nem (vagy másképp) szelektálnak, mint a tenyésztéses technikák. Így esély van arra, hogy addig rejtett szervezetek, aktivitások is

nyomon követhetők legyenek. Az elkövetkező lapokon ezt mutatjuk be alkalmazott környezet-bakteriológiai elemzések értékelésén keresztül.

V.3.1. Szennyvíziszap rothasztó mikrobaközösségének elemzése a gáztermelés szempontjából optimális üzemi hőmérséklet megállapítására

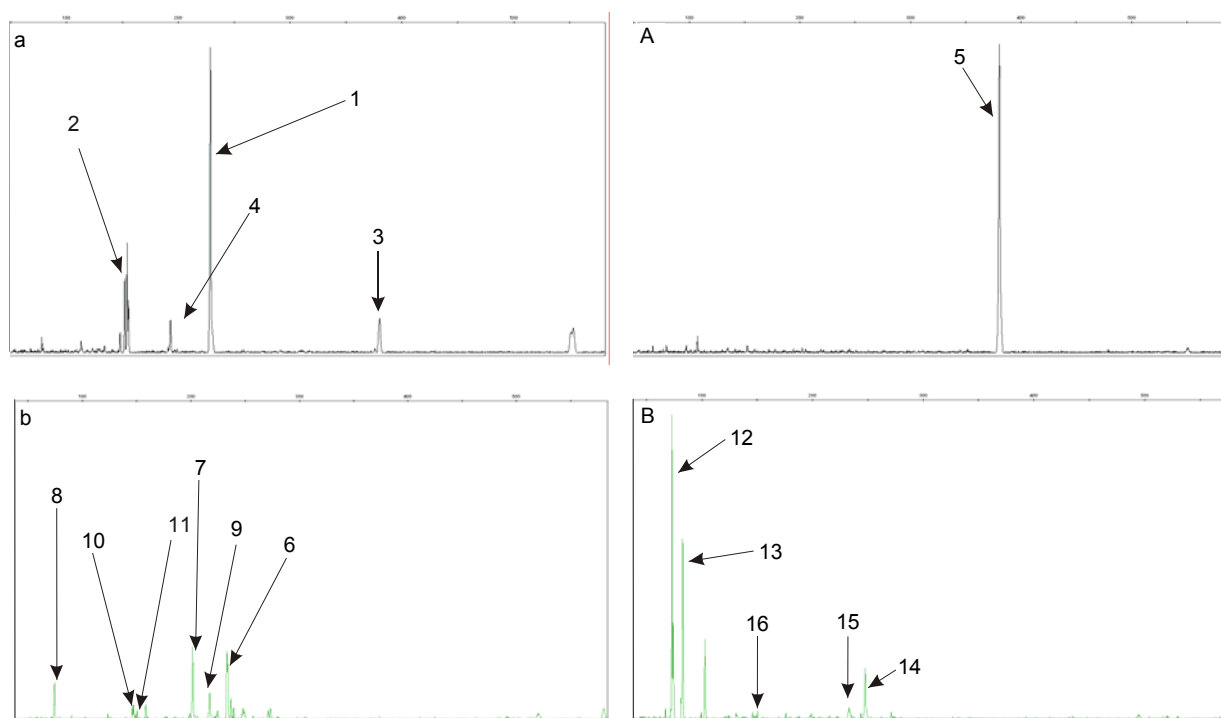
A szennyvíziszap rothasztókkal (biogáz termelés) kapcsolatos szakirodalom megegyezik abban, hogy a gáz (ill. metán) kihozatala illetően az üzemi tapasztalatok szerint két "jó" hőfoktartomány van. Ezek a 35 °C körüli mezofil és az 55 °C körüli termofil tartomány. Azt azonban, hogy ennek a "jóságnak" a hátterében milyen mikrobaközösségek állnak, milyen közösségi anyagcsere biztosítja a gáztermelést, részleteiben nem elemezték. Különösen nem fordítottak arra gondot, hogy hogyan kell egy mezofil reaktort termofil üzemre átállítani, mi történik a hőmérséklet emelés közben a mikrobaközösségek szintjén. Jellegzetes "fekete doboz", amely megismerésre vár. A kérdések megválaszolására a Fővárosi Csatornázási Művek Zrt. Dél-pesti Szennyvíztisztító Telepének kísérleti rothasztói segítségével nyílt lehetőség. Azokra a technológiai kérdésekre vártak választ, hogy mi lehet az üzemi mezofil reaktorok optimális hőfoka, valamint, hogy érdemes-e és hogyan kell felfűteni az üzemi reaktorokat a termofil tartományba.

A szennyvíziszap rothasztók mikróba közösségének tanulmányozását azzal kezdtük, hogy megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a hosszabb időn át stabilan mezofil (35 °C) és termofil (55 °C) hőmérsékleten üzemelő kísérleti reaktorok társulásainak szerkezetét. 2005. augusztus és november között 5 alkalommal vettünk mintákat és a mikrobaközösségek szerkezetét T-RFLP, klónozás és 16S rDNS bázissorrend elemzés, valamint kemotaxonomiai módszerek segítségével vizsgáltuk. Az eredményt először a legjellemzőbbnek tekinthető T-RFLP mintázatok és klónkönyvtár 16S rDNS bázissorrend elemzés adataival mutatjuk be (29. ábra, 14. táblázat).

A T-RFLP mintázatok és a táblázat alapján szembevetendő a mezofil és termofil közösségek diverzitása közötti különbség. Ez az Archaea domén vonatkozásában tűnik kifejezettebbnek. A Shannon diverzitás index a mezofil Archaea közösség esetében $H = 0.564$, míg a termofil társulásnál $H = 0.133$. A Bacteria doménénél 35 °C-on $H = 1.014$, 55 °C-on pedig $H = 0.741$. Vagyis a számok alapján a termofil közösségek nem csupán kevesebb fajból (az Archaea esetében látszólag csupán egyetlen fajból) tevődnek össze, hanem az egyes fajok alkotta populációk mérete is jelentősen különbözik (vagyis az "egyenletesség" csekélyebb). Természetesen a diverzitás értékeket a T-RFLP mennyiségi eredményeinek korlátozott megbízhatósága miatt nem tekinthetjük túlzottan lényeges információnak. Meg kell még jegyez-

nünk azt is, hogy a mezofil és a termofil közösség fajösszetétele szinte teljesen eltérő.

A fajok élettani tulajdonságait vizsgálva is valószínűsíthető a mezofil közösség nagyobb stabilitása. Az Archaea esetében a kisebb hőmérsékleten túlsúlyban vannak az acetoklasztikus metanogének, mint a *Methanosaeta concilii* valamint egy *Methanosarcina* sp. Mellettük megtalálható a széndioxidot hidrogénnel redukáló *Methanoculleus bourgensis*, míg a termofil reaktorban csupán egy *Methanosarcina* sp. volt kimutatható. Meg kell azonban jegyezni, hogy míg a Methanosaetaceae család tagjai obligát módon acetoklasztikusak, addig a Methanosarcinaceae család egyes képviselőire jellemző, hogy metanolt és dimetil-amint is képesek hasznosítani elektrondonorként.



29. ábra. Az Archaea (a, A) és a Bacteria (b, B) domén tagjainak közösségi T-RFLP mintázata a mezofil (a, b) és a termofil (A, B) kísérleti szennyvíziszap rothasztókból 2005. november 21-én vett minták elemzése alapján. Az emésztés az *AluI* restrikciós endonukleázzal történt. Az egyes T-RF-ek klónozás és bázissorrend elemzés segítségével nyert filogenetikai pozíciója a számok alapján a 14. táblázatban azonosítható.

A *Methanosaeta concilii* viasszaszorulásának fő oka valószínűleg a reaktor hőmérséklet, ugyanis hőmérsékleti optimuma 35 - 40 °C, növekedni pedig 45 °C-ig képes. Emellett a termofil reaktorban nagyobb az illékony zsírsavak és az ammónia koncentrációja is, ami a *Methanosarcina* nemzetség tagjainak kedvez. Ezen taxon acetáttal szemben mutatott K_M értéke jóval nagyobb, valamint ammónia toleranciája ötször akkora, mint a *Methanosaeta* fajoké (Karakashev és mtsai, 2004).

A Bacteria domén esetében a domináns T-RF-ekhez tartozó bázissorrendek többségében nem tenyésztett mikroorganizmusokkal mutatják a legnagyobb egyezést, így ezek alapján nehéz messzemenő következtetéseket levonni. A mezofil reaktor egyik domináns csúcsa rokonságot mutat egy mezofil reaktorból származó fonalas, Chloroflexi subphylum I. csoportba tartozó mikroorganizmussal, amelynek a szerepe a rothasztó iszapjának pehely, ill. szemcse (granulum) képzésében van. Yamada és mtsai (2005) FISH segítségével kimutatták, hogy ezen baktériumok a szemcsék felszínén helyezkednek el fonalaikkal hálózatot képezve. Ez összetartja az iszapszemcsét, amelynek a belsejében így megfelelő mikrokörnyezet tud kialakulni a kis redox potenciált igénylő metanogének számára. Másik fonalas baktérium az igen nagy arányban jelenlevő *Nostocoida limicola*, amely eleveniszapban általánosan kimutatható (aerób) szerkezet. Megállapították, hogy képes anaerób körülmények között is növekedni szénhidrátokat fermentálva, illetve olajsavat is hasznosít ilyen körülmények között (Andreasen és Nielsen 1997).

A 9. számú mezofil Bacteria klón legközelebbi tenyésztett rokona egy *Smithella* sp. E fajokat iszaprothasztókból izolálták, szerepük az acetogenezisben lehet (Liu és mtsai, 1999). A biogáz kis mennyiségben N_2 -t is tartalmaz, ami denitrifikáló baktériumok jelenlétére utal. A mezofil reaktorban két ilyen anyagcserével jellemezhető, a β -Proteobacteria csoportba tartozó klont tudunk kimutatni. Az egyik egy *Acidovorax* sp., amely rövid szénláncú illékony zsírsavakat, pl. acetátot, propionátot hasznosít szénforrásként, valamint fakultatív H_2 autotróf, miközben denitrifikál (Kniemeyer és mtsai, 1999, Park és mtsai, 2005). A másik egy Rhodocyclaceae klón. Ezen család tagjairól is (pl. *Thauera*) leírták, hogy acetáttal nitrátból molekuláris nitrogént állítanak elő (Osaka és mtsai, 2006).

A termofil közösségben a legnagyobb arányban képviselt baktérium egy *Coprothermobacter* sp. E nemzetség tagjai jellemzőek anaerób környezetekben, acetogén, termofil fajok, fontos szerepet játszanak a fehérjék lebontásában. A másik domináns csúcshoz tartozó klón a Thermotogales renddel mutat rokonságot, melyre a szénhidrátok fermentációja jellemző acetát, laktát, CO_2 és H_2 képzése mellett (Miranda-Tello és mtsai, 2004). Ezen a hőmérsékleten is kimutatható egy, a denitrifikáló *Thauera* genuszal bázissorrend rokonságot mutató klón.

A rothasztókat kemotaxonómiai módszerekkel is jellemeztük. Meghatároztuk az egyes markerek mennyiségét és az ujjlenyomatok (kromatogramok) elemzésével következtettünk a mikrobaközösségek összetételére, aktivitásaira is. A mennyiségi jellemzőket a 15. táblázatban összegeztük. A 30. és 31. ábrában egy-egy jellemző zsírsav, ill. kinon ujjlenyomatot mutatunk be. A 32. és 33. ábrákon a menakinonok és zsírsavak főbb csoportjainak arányát láthatjuk.

Kód	Faj	Egyezés (%)	T-RF alatti terület aránya (%)*
BACTERIA			
Mezofil	6 Klón iszaprothasztóból I.	98	27,0
	7 Klón iszaprothasztóból II.	96	18,9
	8 <i>Nostocoida limicola</i> I	97	9,9
	9 <i>Smithella</i> sp.	99	6,4
	10 <i>Acidovorax</i> sp.	100	4,6
	11 Rhodocyclaceae klón	91	1,7
Termofil	12 Klón iszaprothasztóból III.	98	32,8
	13 <i>Coprothermobacter</i> sp.	97	25,8
	14 Klón szemétlerakó csurgaléklevéből	98	9,6
	15 <i>Dokdonella</i> sp.	95	2,9
	16 <i>Thauera</i> sp.	96	1,2
	Chl1 Chloroflexi klón I.	94	-
	Chl2 Chloroflexi klón II.	95	-
	Chl3 Chloroflexi klón III.	98	-
	Pl Planctomycetes klón	97	-
ARCHAEA			
Mezofil	1 <i>Methanosaeta concilii</i>	98	51,0
	2 Klón iszaprothasztóból IV.	91	23,7
	3 <i>Methanosarcina</i> sp. I.	97	9,0
	4 <i>Methanoculleus bourgensis</i>	96	5,2
Termofil	1 <i>Methanosarcina</i> sp. II.	97	94,0
	Mt <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	99	-

14. táblázat. A kísérleti mezofil és termofil iszaprothasztó reaktorok klónozás és 16S rDNS bázissorrend elemzés segítségével azonosított jellegzetes közösségalkotó mikrobái. A területarányokat a 29. ábrán bemutatott T-RF-ek esetében, csak az 1 %-nál nagyobb csúcs alatti területek vonatkozásában értelmeztük.

Ha elfogadjuk azt a szakirodalomban bevett megállapítást, hogy a zsírsavak mennyisége a biomasszával arányos (White és mtsai, 1979; Bobbie és White, 1980), akkor megállapíthatjuk, hogy a termofil reaktorban a biomassza mennyisége mintegy negyede a mezofil reaktorban tapasztaltnak. Ugyanakkor a kinonok mennyiségét a mikroorganizmusok aktivitásával, anyagcsere sebességével tartják arányosnak. Ezek szerint a termofil reaktor mikróba közössége sokszoros sebességgel működik a mezofilhez viszonyítva. Talán ezzel magyarázható a nagyobb gázkihozatal is. Ami a diverzitási és egyenletességi indexeket illeti, ez esetben nem mutatható ki a termofil mikrobióta vonatkozásában sem a zsírsav, sem a menakinon profil szegényedése, sőt még az egyenletesség is növekszik. Nem szabad azonban elfelejteni, hogy ez utóbbi értékek nem közvetlenül a fajokra, hanem inkább azok anyagcseréjére jellemzőek, vagyis ha a faji spektrum szegényedni is látszik (a T-RFLP szerint) a közösségi anyagcsere spektruma feltehetően nem szűkül (Tauber és mtsai, 2007).

Mielőtt az egyes kemotaxonómiai komponensekhez köthető jellegzetes mikrobaközösségeket vizsgálnánk, meg kell jegyezzük, hogy sem a kinonok, sem pedig az általunk elemzett zsírsav frakció elemei nem "univerzális bélyegek". A metanogén szervezetek (de más Archaea) esetében sem találjuk meg, ill. jellemzőek ezek a komponensek. Ugyanez igaz a kinonok esetén a fermentáló szervezetek egy jó részére, stb. Vagyis ezzel a módszerrel csak a közösség egy nem pontosan körülhatárolható szelete vizsgálható (Rajendran és mtsai, 1994).

	Mezofil rothasztó		Termofil rothasztó	
	Menakinon*	Zsírsav	Menakinon*	Zsírsav
Mennyiség**	1.977631 µM	361,6 nM	2.191165 µM	91,2 nM
Diverzitás***	5.282	24,399	6.734	25,766
Egyenletesség***	0.220	0,530	0.269	0,629

*A november 21-i mintában az össz-ubikinon mennyiséget nem határoztuk meg.

**1 g szárazanyagban

***Hu és mtsai (1999) nyomán

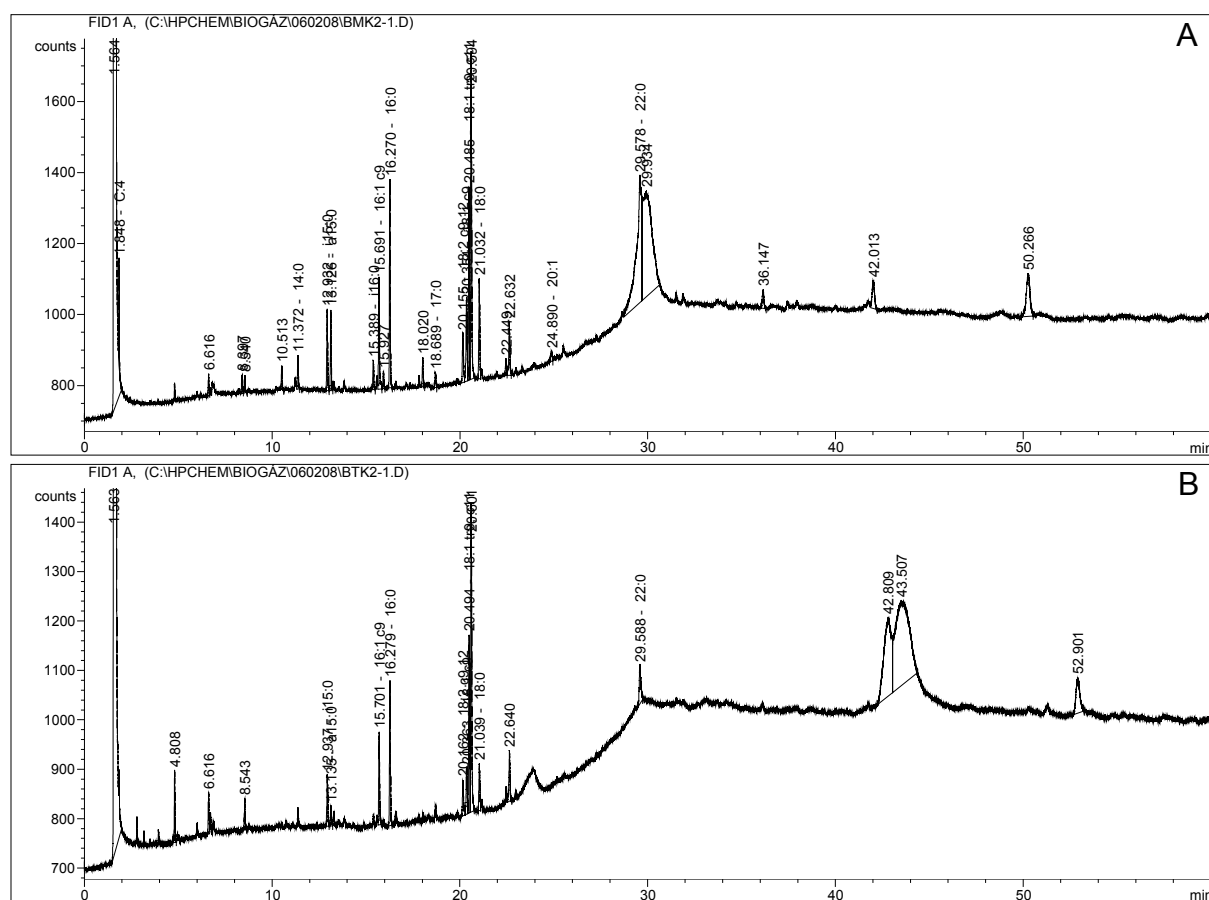
15. táblázat. A mezofil és a termofil kísérleti szennyvíziszap rothasztókból 2005. november 21-én vett minták kemotaxonómiai jellemzői.

A két kemotaxonómiai eljárás a szulfátredukálók nem túl nagy mennyiségi, ugyanakkor nagyon aktív jelenlétéről tanúskodik. A kinonok HPLC spektrumán (31. ábra) az MK-5(H2) minden egyéb kinont nagyságrendileg meghaladó mennyisége szembetűnik. Az egyes mintákban e mellett még más szulfát légző csoportok is jellemzőek, változó arányban. Közismert, hogy a szulfátredukáló baktériumok (egy szűk redoxpotenciál tartományt kivéve) erős hidrogén kompetítorai a szén-dioxidot hidrogénnel redukáló metanogén baktériumoknak.

A mezofil és termofil közösségek markáns különbséget mutatnak a jó pár Gram-negatív baktériumra jellemző Q-6 és Q-7 ubikinonok mennyiségét tekintve. Q-6 nagy mennyisége a termofil, Q-7-é pedig a mezofil működés jellemzője volt, s a másik kinon mindkét esetben jóval alacsonyabb mértékben volt jelen. A részlegesen telített ubikinonok (pl. Q9H2, Q10H2) megjelenése egyes mintákban mikrogombák (pl. élesztő) jelenlétére is utal.

A közösségi dinamika szempontjából koránt sem mellékes eredmény, hogy bizonyos mintákban olyan nagy lánchosszúságú, többszörösen telített menakinonok voltak kimutathatók, amelyek a minta aktinobaktérium fajgazdagságára utalnak. E mikrobák tehát nem mindig vannak jelen a rothasztó baktérium-közösségében e módszerrel kimutatható mennyiségben. A közösségi anyagcsere szempontjából semmiképp nem elhanyagolható kérdés, hogy milyen

szerepet tölthetnek be a széleskörű anyagcsere potenciállal bíró aktinobaktériumok (pl. xenobiotikumok [gyógyszermaradványok] bontása).

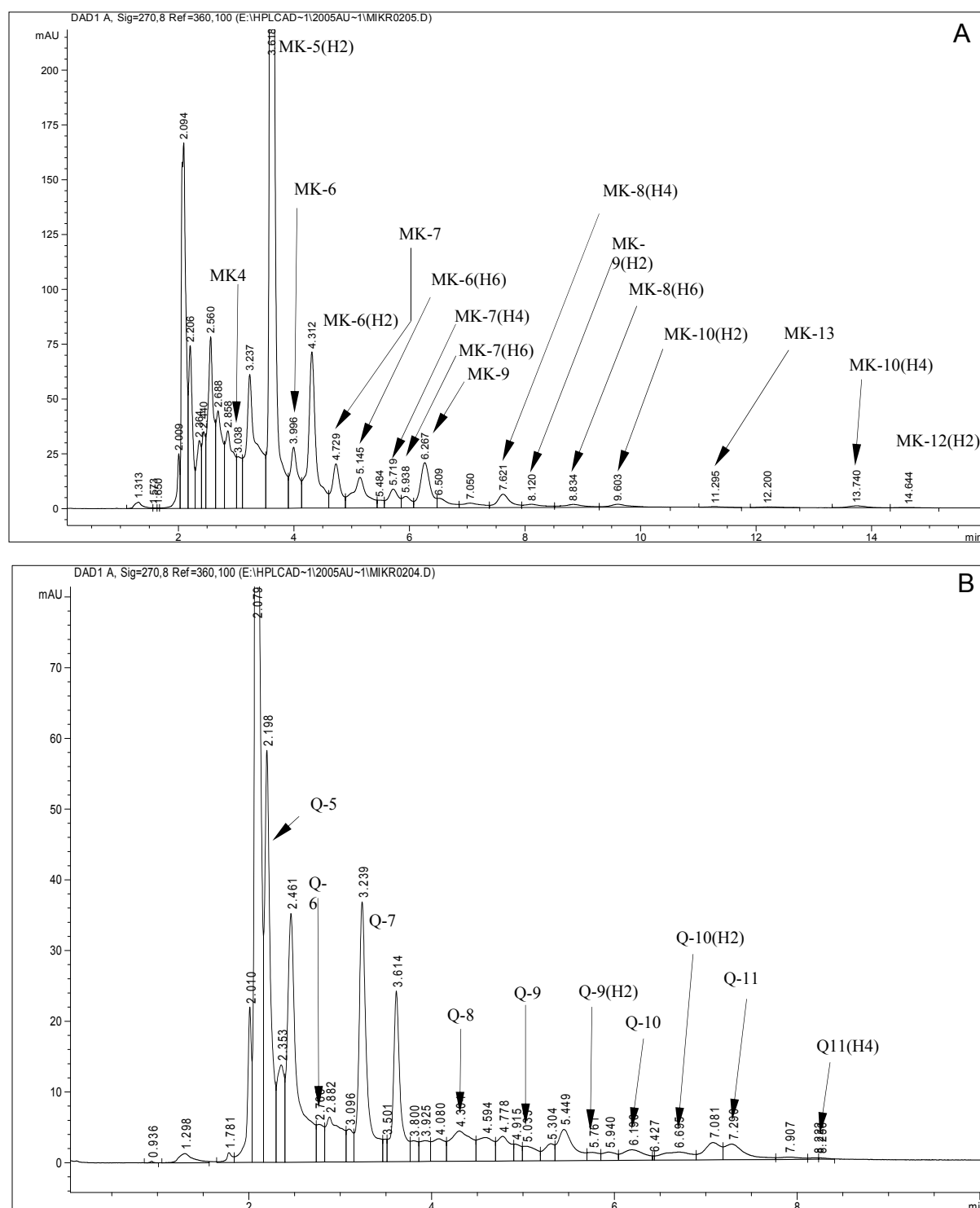


30. ábra. A mezofil (A) és a termofil (B) kísérleti szennyvíziszap rothasztókból 2005. november 21-én vett minták zsírsav (metil észter) profilja.

Mind a kinonok, mind pedig a zsírsav profil elemzés alkalmazhatósága szempontjából lényeges megfigyelés, hogy az Enterobacteriaceae család tagjainak jelenléte a termofil mintákban csekély, ill. elenyésző mennyiségben volt valószínűsíthető. Teljes hiányuk nem valószínű, de e környezetben úgy tűnik, hogy a folyamatos utánpótlás ellenére elpusztulnak, ill. inaktív állapotba kerülnek.

A két ujjlenyomat eljárással végzett elemzések szomorú következményeként kell elmondani, hogy a domináns Bacteria klónok között pl. a szulfátredukálókat DNS alapon nem találtuk meg. Nem kizárt, hogy a szulfátredukálók kinonjai egyes klónokban jellemzőek lehetnek, ugyanakkor a kémiai elemzések alapján mindenképp jellemző szulfátredukciót pl. *Clostridium* típusú fermentálók végzik. A két vizsgálat alapján megerősödik a kép, hogy a mezofil közösségre jellemző nagyobb változatosság valószínűleg nagyobb stabilitást jelent, míg a termofil reaktor talán a biopolimerek hatékonyabb bontásával több szubsztrátot biztosít a

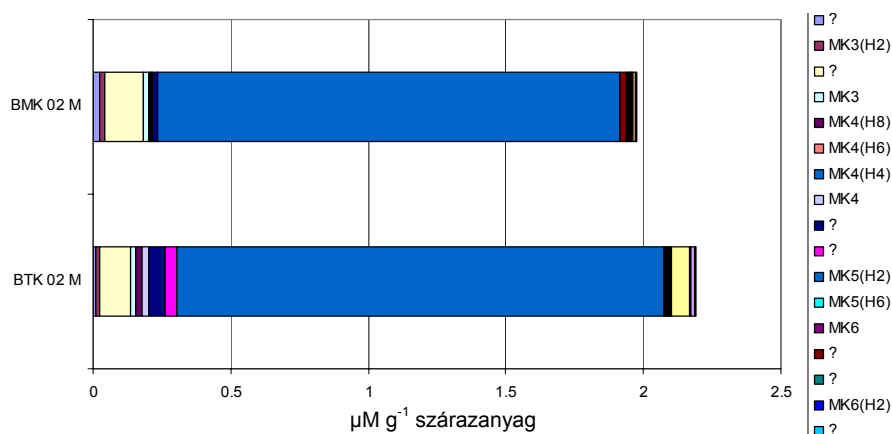
metanogén baktériumok számára (Tauber és mtsai, 2007).



31. ábra. A termofil kísérleti szennyvíziszap rothasztóból 2005. november 21-én vett minta menakinon (A) és ubikinon (B) profilja.

2006. május 23-tól megkezdtek a rothasztó felfűtés mikrobaközösségekre gyakorolt hatásának vizsgálatát. Legelőször is tekintsük át a hathetes periódusban a fizikai-kémiai paraméterek megváltozását (34 - 37. ábra) a T2 reaktor adatai alapján. A 35. ábrán jól látható,

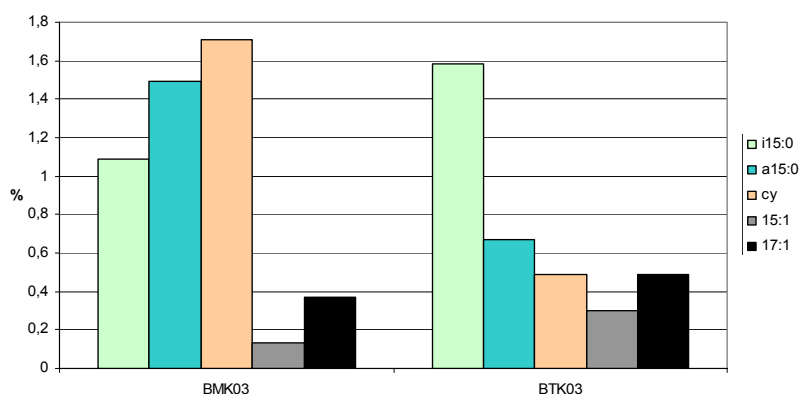
hogy 45 és 50 °C között a rendszer redox potenciálja folyamatosan emelkedett, majd ezután hirtelen -600 mV értékre csökkent, és a továbbiakban is tartósan ilyen kicsi maradt. 58 °C fölötti hőmérséklet fölött a gáz metántartalma hirtelen csökkenésnek indult, majd 66 °C-nál a kimutathatósági határ alá csökkent. A pH és az illósav tartalom egymással ellentétes irányú változásai jól megfigyelhetők a 36. ábrán. A pH mindvégig a metanogének által tolerálható intervallumban mozog, viszont több esetben az optimálisnak tartott 6,8 - 7,2 értéknél nagyobb. Látható, hogy az illósav tartalom az egész kísérlet időléptékében nézve nőtt, miközben az 55 °C körüli termofil hőmérsékleti tartományban intenzív kicsúcsosodást mutat. A pH csökkenése ugyanekkor megfigyelhető. A lúgosság (zömében az ammónium ion koncentráció határozza meg) monoton emelkedést mutat, csak az illósav termelés csúcsa időpontjában törik meg ez a trend. A biogáz hozam (37. ábra) maximuma úgyszintén 55 °C körüli hőfok értéken maximális (a 35 °C-on tapasztaltak majd kétszerese), miközben a biogáz metántartalma nem változott. A napi átlag gázhozam 51 °C alatt 2,36 m³, míg 51 és 63 °C között 3,15 m³ volt. A mezofil tartományban a hozamgörbe nagy ingadozásainak ellenére a maximális gáztermelés a gyakorlatban alkalmazott 35 °C fölött mutatkozott (39 és 47 °C között).



32. ábra. A mezofil (BMK) és a termofil (BTK) kísérleti szennyvíziszap rothasztóból 2005. november 21-én vett minta menakinon tartalmának megoszlása. A legnagyobb tömegben jelenlevő menakinon [MK5(H2)] a szulfátredukálókra (pl. a *Desulfobulbus*) lehet jellemző.

A mikróbaközösségek változását a felfűtési kísérlet során a 38 - 40. ábrákon mutatjuk be a mintákból kivont közösségi DNS-re, valamint RNS-re alapozott T-RFLP ujjlenyomatok alapján. Előzetes kísérleteink alapján nyilvánvaló, hogy a hőmérséklet növelése hatására megváltozó mikróbaközösségek felelősek az egyéb fizikai és kémiai paraméterek megváltozásáért, főképp a gáztermelés növekedéséért. A felfűtési kísérlet során azonban kiemelt figyelmet kell fordítanunk az aktív anyagcserét folytató fajok populációinak kimutatására. A DNS alapú módszer nem biztos, hogy megfelelő ez esetben. A DNS ugyanis meglehetősen stabil, a kör-

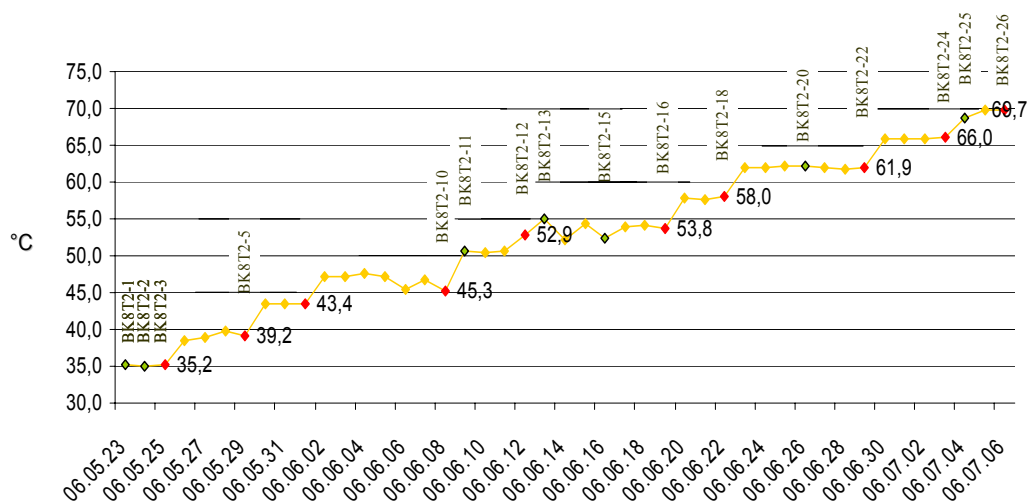
nyezeti hatásoknak ideiglenesen ellenálló molekula. Vagyis a nem aktív, valamint a már elpusztult sejtekből az iszaprothasztó körülményei között akár több napig is kimutatható és a nagyon gyors közösségváltozások nyomon követésére nem tökéletesen alkalmas. Az aktív populációk kimutatásában az RNS alapú diverzitás elemzés feltehetően érzékenyebb.



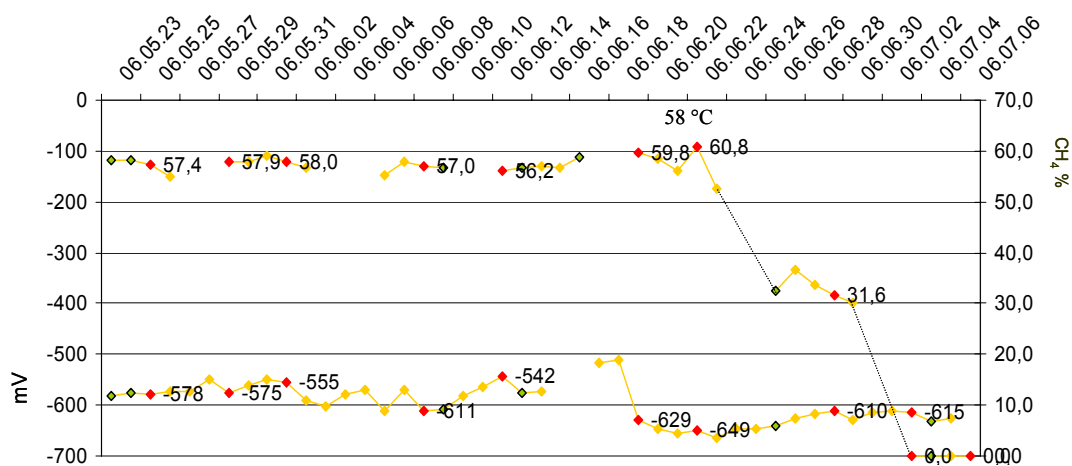
33. ábra. A mezofil (BMK) és a termofil (BTK) kísérleti szennyvíziszap rothasztóból 2005. november 21-én vett minta főbb zsírsav komponenseinek megoszlása. A ciklopropán (cy) zsírsavak pl. a bélbaktériumokra, míg a 17:1 zsírsavak, pl. a szulfátredukálókra jellemzőek.

A DNS T-RFLP eredményét áttekintve (38. ábra) az Archaea közösségben két nagy átrendeződés tapasztalható. Egészen az 55 °C-ra való felfűtésig a *Methanosaeta concilii* (Mc) dominálja a reaktort. Ezt a fajt gyakran írják le, mint mezofil szennyvíziszap rothasztók domináns metanogén baktériumát, szaporodásának hőmérsékleti optimuma 35 és 40 °C között van. A *Methanoculleus bourgensis* jóval kisebb arányban reprezentált, mindössze 1 %-ot tesz ki a mezofil közösségben. 55 °C-on a legkiegyenlítettebb a közösség összetétele, 59 °C-on pedig már egy *Methanosarcina* (Ms) faj kerül túlsúlyba. E nemzetség fajai, akárcsak a *Methanosaeta* fajok alapvetően acetoklasztikus, azaz az acetát metil csoportjából metánt előállító mikroorganizmusok. Az acetát mellett sok "egy szén" szubsztráton is képesek növekedni. Ezen csoportot 63 °C-on a már kisebb hőmérsékleteken is jelen lévő *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Mt) váltja, amely széndioxidból és hidrogénből, valamint egyes törzsek formiátból képesek metánt előállítani. Hőmérsékleti optimuma 65 °C körül van, növekedést pedig 45 °C-tól elkezdve esetenként akár 75 °C-ig is mutat (Wasserfallen és mtsai, 2000).

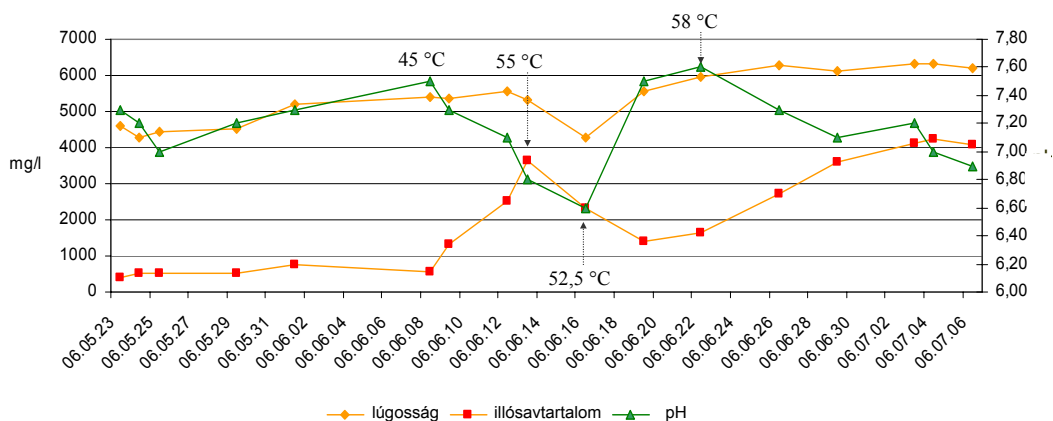
A Bacteria domén esetében a kísérlet során két, jól elkülöníthető közösség volt kimutatható. Az elsőt a Chloroflexi subphylum-ba tartozó, illetve Planctomycetes klónok jellemezték. Emellett jelentős volt a *Nostocoida limicola* I. aránya is, amely azonban csupán 47 °C-ig volt jelen, teljes eltűnése pedig 55 °C-on következett be. A második közösség 55 - 70 °C-on végig regisztrálható volt jelentős változások nélkül. Ebben az állandóan termofil hőmérsékleten mű



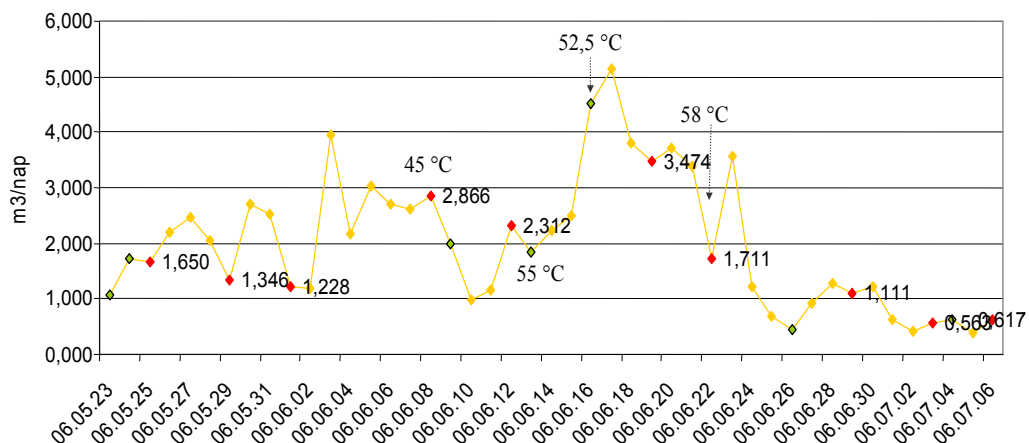
34. ábra. A reaktorhőmérséklet alakulása a T2 reaktorban és a mintavételi időpontok a felfűtési kísérlet alkalmával. Piros színnel a hőmérsékleti lépcsők végén vételezett mintákat (az adott hőmérséklethez adaptált közösség), zölddel az egyéb mintákat tüntettük fel.



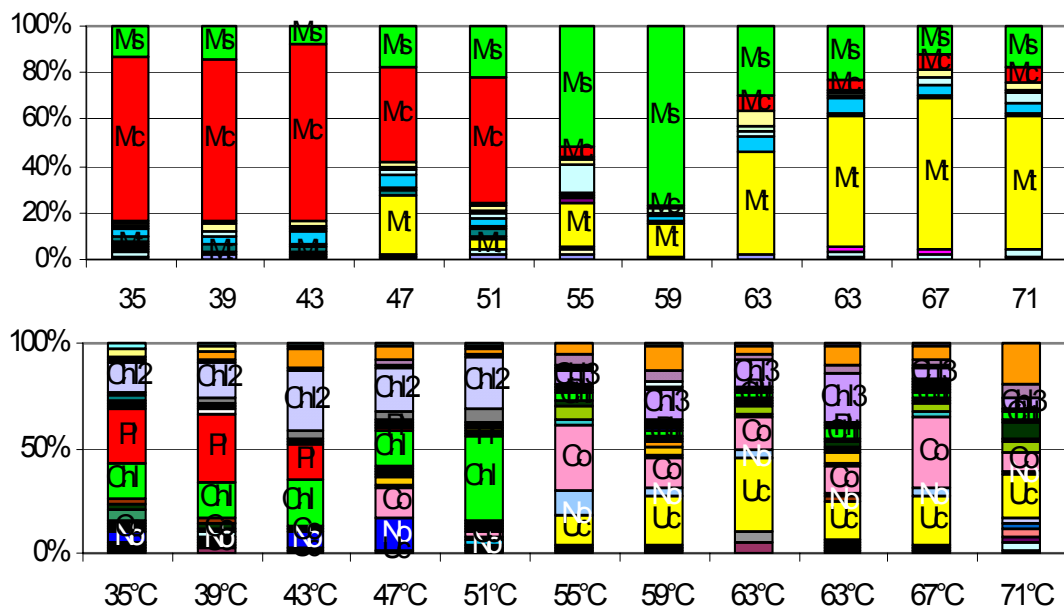
35. ábra. A redox (elektród) potenciál és a biogáz metántartalom változása a T2 reaktorban a felfűtési kísérlet során.



36. ábra. A lúgosság, az illósav tartalom és a pH alakulása a T2 reaktorban a felfűtési kísérlet során.



37. ábra. A biogáz hozam alakulása a T2 reaktorban a felfűtési kísérlet során.



38. ábra. Az Archaea (felül) és a Bacteria (alul) közösség megváltozása a T2 reaktorban végzett felfűtési kísérlet során a DNS T-RFLP eredmények alapján. Az ábrán az *AhuI* restriktációs enzimmel nyert 1 %-nál nagyobb területű T-RF-ek görbe alatti területei szerepelnek százalékosan. Mc = *Methanosaeta concilii*, Ms = *Methanosarcina*, Mt = *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, Chl = Chloroflexi klón I., Chl2 = Chloroflexi klón II., Chl3 = Chloroflexi klón III., Pl = Planctomycetes No 7, Co = *Coprothermobacter* sp., Uc = Thermotogales klón, No = *Nostocoida limicola*.

ködő kísérleti reaktorokból már jól ismert *Coprothermobacter* sp. illetve a Thermotogales rokonssággal rendelkező iszaprothasztóból izolált klón dominált.

Elemezve a közösségek Shannon diverzitás index értékeit nem jellemző erős korreláció a hőmérséklet és a diverzitás értékek között, az azonban nyilvánvaló, hogy mind az Archaea, mind pedig a Bacteria esetében jellemző, hogy a fajgazdagság 55 °C-on a legnagyobb mértékű (ellentétben előzetes vizsgálataink eredményével).

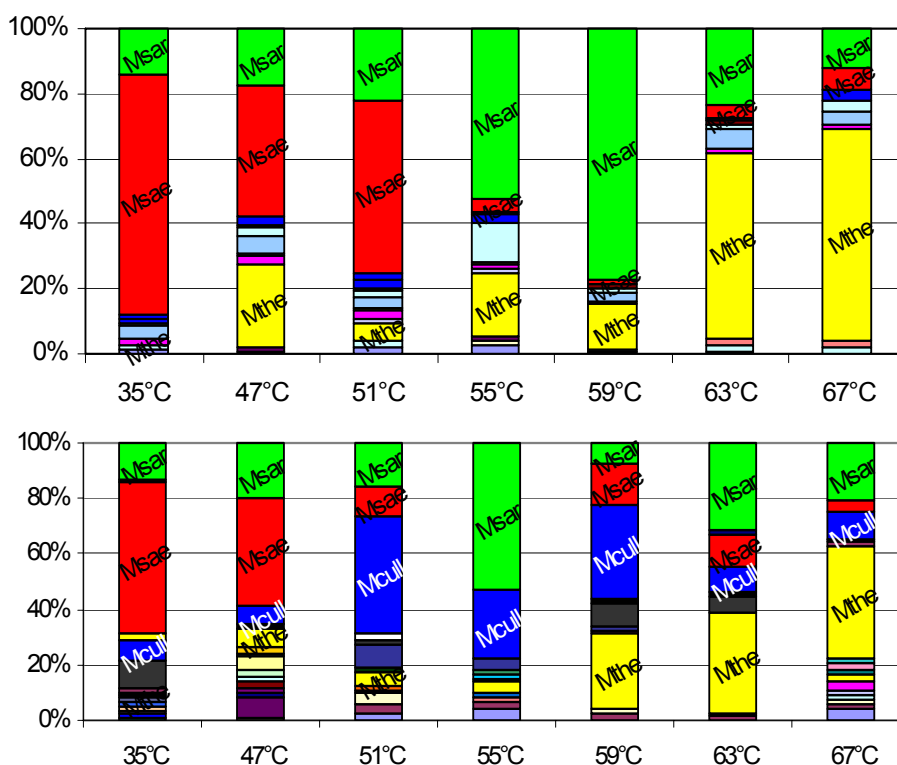
Elmondható tehát, hogy míg a mezofil mikroba közösség jelentős változás nélkül 35 °C-tól egészen 50 °C-ig aktív volt, addig a termofil metanogenezis csupán fele ilyen tág hőmérséklet tartományban, 55 és 63 °C között mutatott megfelelő biogáz produkciót. A közösség szerkezet dinamikáját illetően, míg az Archaea domén esetében a különböző hőmérsékletek jellemző fajösszetétele a dominancia viszonyok megváltozásával alakult ki, addig a Bacteria doménnél az átalakulás drasztikus, 50 °C fölött a reaktor egy tökéletesen más társulással jellemezhető. Annak ellenére, hogy DNS alapon a metántermelő *Archaea*, valamint a lebontásért felelős *Bacteria* közösségben nem tapasztalunk jelentős változásokat a mezofil hőfoktartományban, nagy ingadozások voltak a gázhozamban. 51 és 53 °C közötti intervallumban nagyban átrendeződik mindkét társulás, amelynek oka valószínűleg egy hőmérsékleti küszöbérték elérése (és a biogáz hozam esése is jelzi). A termofil tartomány szűkebb. Szintén egységes, de a mezofiltól eltérő mikroba közösség jellemzi. A biogáz termelés itt a legnagyobb, amit az új metántermelő fajoknak, és a jelentős illósav termelésnek tulajdoníthatunk. 70 °C fölött a gáztermelés teljesen megszűnik annak ellenére, hogy a zsírsavak koncentrációja nem csökken. Ez a tény az acetát hasznosító metanogének eltűnésének köszönhető.

Amint az a 39. és 40. ábrán látható, az RNS alapú vizsgálatok alapján egy, a restrikciós endonukleázok hasítási helye alapján a *Methanoculleus* genusba tartozó klón (sötétkék) magas aktivitását indikálják a termofil hőmérséklettartományban. Jól látszik a tipikusan mezofil *Methanosaeta concilii* aktivitásának drasztikus csökkenése 47 °C fölött. 59 °C-on újra megjelennek az ezen fajra jellemző T-RF-ek, ezek valószínűsíthetően a termofil rohasztókból leírt *Methanosaeta thermophila*-hoz tartoznak. (Sajnálatos módon restrikciós mintázatuk alapján nem tudtunk különbséget tenni köztük, ezért az ábrán mindkét csoport piros színnel szerepel.) Összességében elmondható, hogy a termofil tartományban az előzetes vizsgálatainknál nagyobb arányban van jelen, illetve aktív egy a metánt csak H₂-ból és CO₂-ből előállító, a szekvencia adatok alapján a *Methanoculleus* nemzetségbe tartozó faj.

A Bacteria domén esetében az RNS és DNS alapján készült közösségi T-RFLP mintázat (*AluI*) változások mikéntje nagyban eltér, és ebben az esetben a nagyobb különbség a mezofil hőmérséklettartomány mintáinál tapasztalható (40. ábra). Az előző kísérletekben tapasztalt magas *Chloroflexi* subphylum I arány ebben az esetben is jellemző, bár a mezofil mintában világoszölddel jelölt, az adatbázisok alapján lehetséges *Chloroflexi* faj („Chl”) az előzőektől eltérő restrikciós mintázatot mutat. Mindemellett a termofil társulást RNS alapon ugyanúgy a *Coprothermobacter* sp. és *Thermotogales* rendbeli nem tenyésztett faj dominálja.

A két módszerrel nyert eredmények különbségét az magyarázhatja, hogy a magasabb hőmérsékleten gyorsabb minden molekula, így a DNS degradációja is, vagyis a folytonos rá-

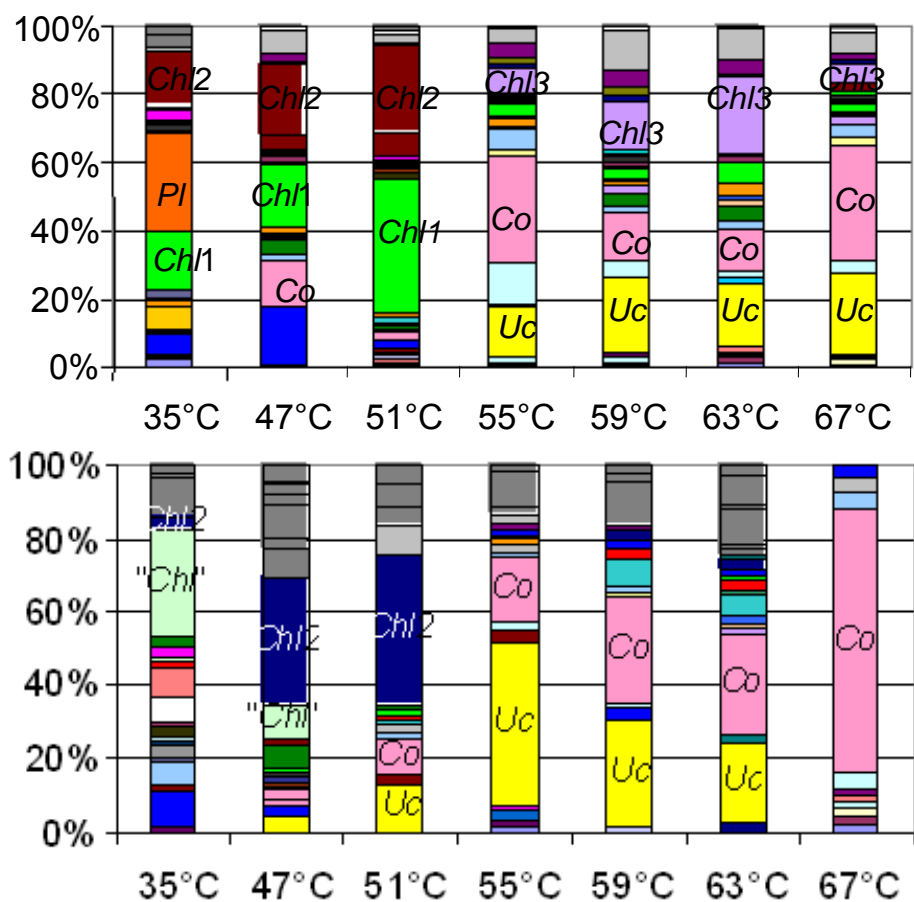
táplálással bekerülő, primer illetve szekunder iszapból származó DNS molekuláké is. Így ezek a nem jellemző molekulák az RNS vizsgálat esetén kevésbé zavarják méréseinket.



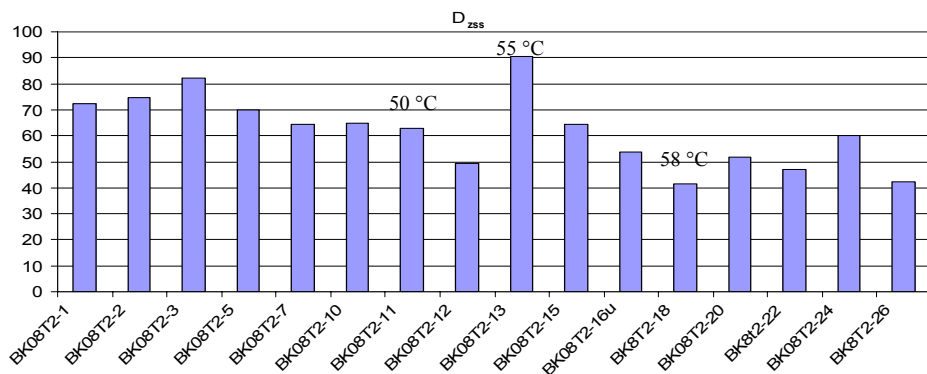
39. ábra. Az Archaea domén közösség-átrendeződése DNS (felül) és RNS (alul) T-RFLP adatok alapján (*AluI* restrikciós enzim) a T2 reaktorban végzett felfűtési kísérlet során. (A DNS adatsort a könnyebb összevethetőség érdekében ismételtük meg.) Az ábrán az 1 %-nál nagyobb területű T-RF-ek görbe alatti területei szerepelnek százalékosan. Msae = *Methanosaeta concilii* és *Methanosaeta (termophila)*, Msar = *Methanosarcina*, Mthe = *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, Mcull = *Methanoculleus*.

Az abiotikus paraméterek alakulásának háttérében álló mikrobaközösség változásokat a karakterisztikus kemotaxonómiai bélyegekkkel is vizsgáltuk. 55 °C hőmérsékleten a zsírsavak diverzitásának hirtelen és markáns megugrása (41. ábra) utal arra, hogy jelentős közösségátrendeződés vette kezdetét. Az elkövetkező időszakban a termofil hőmérsékleti optimum közelében jól látható a közösség alkalmazkodása ehhez a hőmérsékleti szinthez. Ezt az alkalmazkodást a zsírsavdiverzitás folyamatos csökkenése jelzi 55 °C elérése után, ez ugyanis az adott hőmérsékleti szintre jellemző taxonok szelektív feldúsulását tükrözi az átrendeződés kezdetén hirtelen diverzzé vált közösségből.

A marker-diverzitás csökkenése mögött álló közösségalkalmazkodás meglétét alátámasztja a biogáz hozam alakulása is a kísérlet során (37. ábra). Ebben a termofil időszakban ez is erőteljes növekedésnek indul, és a teljes kísérletre nézve is itt éri el maximumát. Ezt tá-

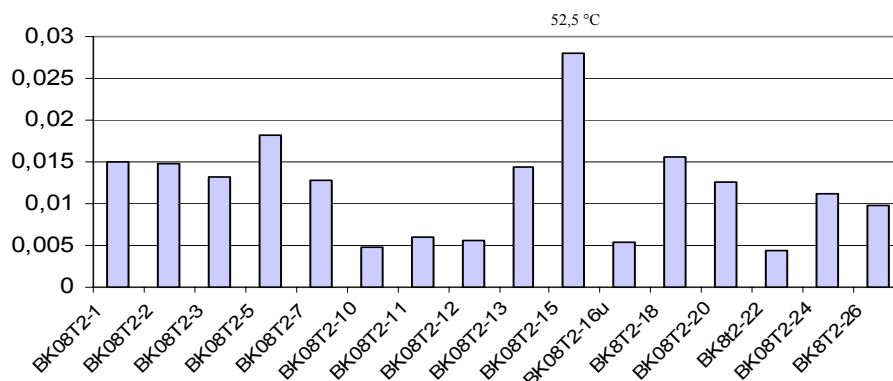


40. ábra. A Bacteria domén közösség-átrendeződése DNS (felül) és RNS T-RFLP adatok alapján (*AhaI* restrikciós enzim) a T2 reaktorban végzett felfűtési kísérlet során. (A DNS adatsort a könnyebb összevethetőség érdekében ismételtük meg.) Az ábrán az 1 %-nál nagyobb területű T-RF-ek görbe alatti területei szerepelnek százalékosan. Chl = Chloroflexi klón I., Chl2 = Chloroflexi klón II., Chloroflexi klón III., Pl = Planctomycetes, Co = *Coprothermobacter* sp., Uc = Thermotogales klón.



41. ábra. A közösségi zsírsav metil észter profil alapján számolt Hu (1999) féle diverzitásindex változása a T2 reaktorban végzett felfűtési kísérlet során.

masztja alá, hogy ugyanebben az időszakban a menakinonok diverzitása is folyamatos csökkenést mutat, ami az összes mintában mennyiségileg messze domináns kinonok relatív visszaszorulásának köszönhető. Ez a menakinon, a HPLC elemzéssel párhuzamosan elvégzett tömegspektrometriás elemzéssel alátámasztva az MK5(H2) kinonnal azonos, a *Desulfobulbus* nemzetség tagjait indikálja. Ugyanennek a dominancia-csökkenésnek a jeleit láthatjuk a szulfátredukáló baktériumokra jellemző zsírsavak ($C_{15:1}$, $C_{17:1}$) relatív mennyiségének alakulásában (42. ábra) is (Zelles, 1996).



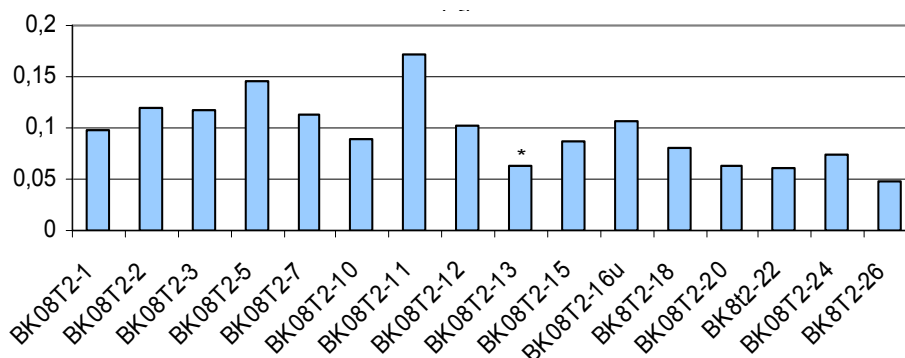
42. ábra. A szulfátredukáló baktériumok jellemző zsírsavai ($C_{15:1}$, $C_{17:1}$) (relatív) mennyiségének alakulása a felfűtési kísérlet során a T2 reaktorban.

Az aktinobaktériumok kinonjai ugyanebben az időszakban hirtelen leeső, majd növekvő relatív mennyiséggel jellemezhetők (a domináns menakinon visszaszorulásától függetlenül is). Mivel ezek a baktériumok a szervesanyag-lebontásban aktív és sokoldalú szerepet játszanak, markereik ilyen megváltozása értelmezhető annak jeleként, hogy a szerves anyagot bontó mikrobaközösség keresztülmegy egy összeomláson, majd újra felépül a termofil közösség szerkezetre való átállás során.

A főként fermentáló baktériumokra jellemző ciklopropil zsírsavak relatív mennyisége 50 °C-nál mutat maximumot, ami egybeesik az illósavak felhalmozódásának, és a pH csökkenésének kezdetével. Később, a pH-minimummal (vagyis az illósav termelés maximumával) egybeesően újabb csúcsuk volt mérhető. A Gram-pozitív baktériumok általános markereiként ismert elágazó láncú zsírsavak relatív mennyiségének minimuma egybeesik az illósavak mennyiségi maximumával a termofil periódus elején (43. ábra). Ez azt sugallja, a fermentáló, illósavakat termelő baktériumokat a Gram-negatív szervezetek körében érdemes keresnünk.

Vizsgálataink szerint összefoglalóan megállapíthattuk, hogy a rothasztók mikrobaközösségeinek nagyfelbontású elemzése alapján igazolódott az a sejtés, hogy az üzemeltetésnek két hőmérsékleti optimum tartománya van. A mezofil közösség legnagyobb stabilitással (az eddig gondolt 35 °C helyett) 40 °C és 45 °C között működik, majd egy je-

lentős közösség szerkezet átalakulás után a termofil optimum 55 - 58 °C között alakul ki. A termofil szakasz azonban sokkal szűkebb hőfoktartományban működik, 58 °C felett a metanogén közösség hirtelen összeomlik. A biogáz kihozatal optimuma a termofil szakaszban van. A kemotaxonómiai vizsgálatok kiválóan megerősítették azt, hogy ilyenkor a legkisebb a szulfátredukálók kompetíciója és ugyanakkor a savtermelő szervezetek aktivitása a legnagyobb. A nemtenyésztési mikrobiológiai vizsgáló eljárások komplex alkalmazása sok olyan működésbeli törvényszerűséget tárt fel, amelyekkel hasznosan járulhattunk hozzá az üzemeltetési ismeretek bővítéséhez, össze tudunk állítani egy javaslatot az üzemi mezofil reaktorok termofil tartományba való átállításához.

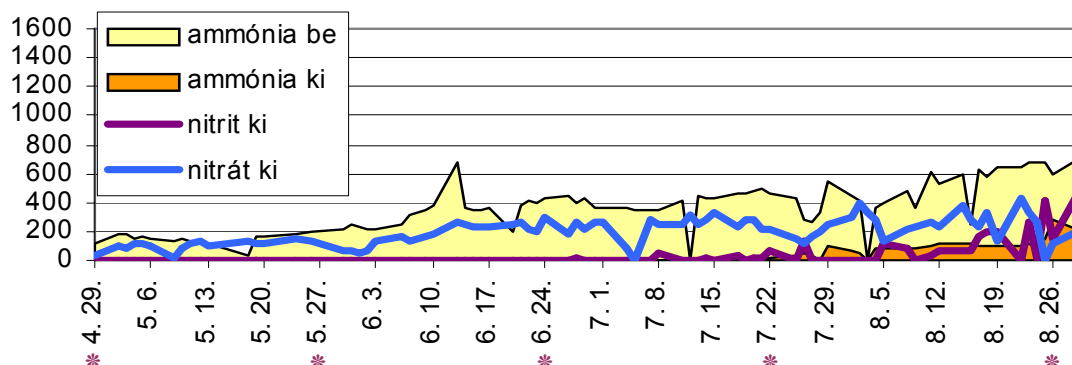


43. ábra. Az elsősorban Gram-pozitív baktériumok jelenlétét indikáló elágazó láncú zsírsavak relatív mennyiségének alakulása a T2 reaktorban a felfűtési kísérlet során. Csillaggal az optimális gáztermeléshez tartozó minimumot jelöltük.

V.3.2. Filogenetikai információval rendelkező funkciógén alkalmazása nitrifikáció vizsgálatában

A Dél-pesti Szennyvíztisztító Telep egyik nagy gondja a rohasztókból származó iszapsűrítési csurgalékvíz elhelyezése, hiszen a szennyvíztisztítás első szakaszába visszavezetett csurgalékvíz a telep ammóniaterhelését mintegy 25%-kal megnöveli. Így a tisztított szennyvízre megkövetelt TN és NH_3 határérték betartása nem egyszerű. A csurgalékvíz ammóniaterhelése elérheti az 1000 mg L^{-1} értéket, ilyen koncentrációban az ammónia rendkívül toxikus és a nitrifikációra is gátló hatású. Az extrém ammóniaterhelésű csurgaléklé külön vonalon történő kezelésének megoldására kísérleti nitrifikáló oszlopot állítottunk össze mordenit töltettel. A kísérlet során a hígított csurgaléklét növekvő ammóniaterhelésekkel juttattuk az oszlopokra (44. ábra).

A nitrifikációnak tulajdonítható hatásos ammóniumion eltávolítás a harmadik héten kezdődött meg, ekkor kezdett emelkedni a kifolyó mintákban a nitrition koncentráció és vele párhuzamosan a nitrát ion mennyisége. A kemoautotróf nitrifikáló baktériumok rendkívül lassan növekednek, ezért érzékenyek a külső környezet változásaira. Rendszerint a laza szerke-



44. ábra. A N-formák aránya kísérleti nitrifikáló oszlopunkon az idő függvényében. Csillaggal jelöltük azokat a mintákat, ahol rétegmintavétel történt.

zetű biofilm alsó rétegében helyezkednek el, ahol még van elegendő oxigén, de felettük gyorsan növekedő heterotróf szervezetekből álló réteg megvédi őket a külső behatásoktól (pl. a szerves anyagoktól). Feltehetően a kezdeti három hét volt az az időszak, amikor ez a komplex szerkezetű biofilm kialakult, és így aktív működésre képes, elegendő mennyiségű nitrifikáló baktérium telepedhetett meg, illetve szaporodhatott el. A kémiai paraméterek változása arra utalt, hogy bár az ammónia-oxidáló és nitrit-oxidáló szervezetek is megtelepedtek, az utóbbiaknak több időre volt szükségük ahhoz, hogy elegendő tömegben legyenek jelen a biofilmben a termelődött nitrit teljes mennyiségének átalakításához. Bár ezek a baktériumok rendszerint szoros kontaktusban élnek a biofilmben, hiszen az egyikük terméke a másik számára szubsztrátként szolgál, a nitrit-oxidálók az ammónia-oxidálóknál is érzékenyebbek környezeti hatásokra, nekik még több időre volt szükség megfelelő nagyságú és stabilitású közösség kialakításához. Miután ez a kolonizációs időszak lezajlott, a kialakult nitrifikáló közösség már elég stabilnak bizonyult, és a kifolyó nitrit esetében a kimutatási határ alatti koncentráció állt be tartósan, míg a nitrát mennyisége a befolyó ammóniának megfelelő volt. A N-mérleg alapján azt is megállapíthattuk, hogy az asszimiláció, illetve aerób denitrifikáció nem okozott számottevő hiányt a kifolyó víz összesített N-értékében. Megjegyezzük, hogy a mordenit ioncserélő kapacitása révén befolyásolja az ammónia koncentrációját mikrokörnyezetekben és lehetővé teszi diverzebb ammónia-oxidáló közösség kialakulását.

A rendszer KOI eltávolítás szempontjából is hatékonynak bizonyult 85% feletti hatásfokkal. Az oldott oxigén tartalmát tekintve stabil, a befolyó szennyvíz 1% körüli oxigéntelítettség értéke az oszlopban és a kifolyó vízben a levegőztetés hatására - a nitrifikáció és a szerves anyag lebontás O_2 fogyasztása ellenére - átlagosan $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ körülire nőtt (90%-os telítettség). A nitrogén-formák alakulása azt mutatja, hogy a rendszer számára a nitrifikáció szempontjából a terhelésnövelés mintegy 500 mg L^{-1} értékig nem okozott gondot. Kellően

stabil biofilm alakult ki. Ennél nagyobb ammónia terhelésnél a kifolyó vízben részben maradék ammónia, részben pedig nitrit jelenik meg. Ez arra utal, hogy a nitrifikáció folyamata bizonyos mértékben gátlódik, de nem az ammónia-oxidáció, hanem a nitrit-oxidáció szintjén.

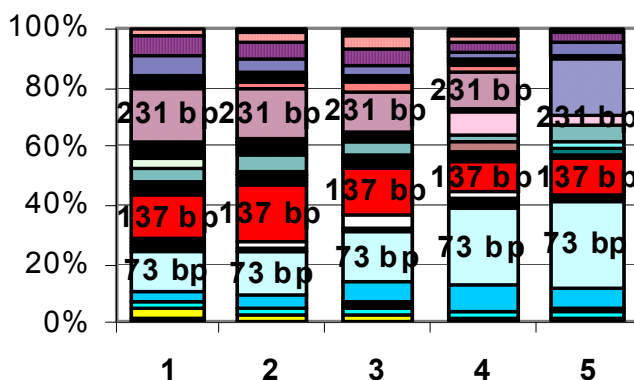
A rendszer baktériumközösségének összetételét T-RFLP vizsgálattal, univerzális primereket alkalmazva ellenőriztük. Az öt különböző időpontból az oszlop közepéről származó biofilm mintákban csak kisebb változások észlelhetők (45. ábra). A 137. bázisnál hasító hellyel rendelkező filospéciesz a nagyobb ammóniakoncentrációk felé haladva csökkenő mennyiségben van jelen. Ugyanez igaz a 231 bp-ral jellemzett csoportra is, míg a 73. bázisnál hasító hellyel rendelkező fajok mennyisége ezzel párhuzamosan növekszik. A közösség erőteljesebb átrendeződésére 600 mg L⁻¹ NH₃ tartalomnál jelentkezik csupán. Feltételezésünk szerint azonban a közösségszerkezet változásáért az ammónia mérgező hatása mellett a megnöött KOI terhelés is felelős lehet. A Bacteria T-RFLP legrészletesebb elemzése (4 különböző enzimmel történő hasítás nyomán a T-RF hosszaknak a riboszómális RNS adatbázisokban elhelyezett nitrifikáló törzsek "in-silico hasítási termékeivel" történő összehasonlítása) alapján sem sikerült nitrifikáló szervezeteket kimutatnunk (sem ammónia oxidáló, sem pedig nitrit oxidáló szervezetet). Emiatt nitrifikáló specifikus kimutatási eljárásokat alkalmaztunk.

A nitrifikáció első, meghatározó lépése az NH₄⁺ oxidációja NH₂OH-ná, amelyet az ammónia-oxidáló baktériumok végeznek, az *ammónia-monooxygenáz* (Amo) enzim segítségével. Az ezt az enzimet kódoló gén csak erre a csoportra jellemző, egy szakaszát (AmoA alegység) felszaporítva az ammónia-oxidálók specifikusan vizsgálhatók.

Az AmoA T-RFLP öt enzimmel kapott hasítási mintázatainak összes lehetséges kombinációját figyelembe véve adatbázisból kerestük ki az egyes T-RF-ekhez tartozó fajokat. Legnagyobb részük nem tenyésztethető, szennyvíztelepek nitrifikáló rendszereiből, eleven iszapból, illetve környezeti, elsősorban talaj- és üledékmintákból hasonló módszerekkel mutatták ki ezeket. A *TaqI* enzimmel nyert fragmens hosszok alapján azonban az ammónia-oxidálók β-Proteobacteria csoportba tartozó két fő ága elkülöníthető: a 219 bázis hosszúságú fragmens a *Nitrosomonas*, míg a 283. bázisnál lévő hasító hely a *Nitrospira* fajokra jellemző. A kísérleteik kezdetén végzett vizsgálatokban - *TaqI* enzimmel hasítva - csak egy csúcsot kaptunk (219 bp-nál), majd később mindkét csúcs megjelent.

A *Nitrospira*-kra jellemző, hogy főleg talajokból illetve természetes vizekből izolálták őket, ill. az azonosíthatatlan fajok túlnyomó többségét is ilyen környezetekben detektálták. Ezek a szervezetek jobban kedvelik a kisebb ammóniatartalmú közegeket, ezzel magyarázható, hogy a kísérlet legelső szakaszában, viszonylag kisebb ammóniaterhelések mellett vannak jelen. A *Nitrosomonas* nemzetség képviselőire jellemző, hogy jól tűrik a nagy ammónia-

koncentrációjú környezetet, az általunk kapott azonosítatlan fajok között is számos biofilmről illetve eleven iszapból származó szervezet található. Két azonosított fajt találtunk, ezek a *Nitrosomonas europaea* és a *Nsm. cryotolerans*, mindkettőt számos esetben izolálták szennyvíztelepekről. A *Nitrospira* nemzetséget egyébként a *Nsp. multiformis* faj képviselte.



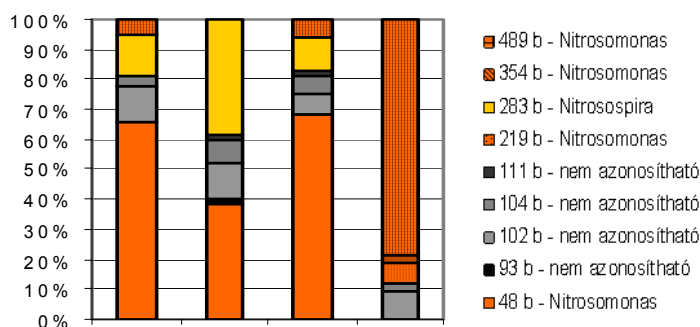
45. ábra. Kísérleti nitrifikáló oszlopunk közepéről (3. mintavételi pont) származó biofilm minták 16S rDNS T-RFLP (*AluI* enzim) mintázatai. Az egyes T-RF hosszakkal képviselt filospécieszek %-os arányát ábrázoljuk a kezdettől 600 mg L⁻¹ NH₃ rátáplálásig. A mintavételi időpontokat csillagok jelzik a 44. ábrán.

Az oszlop 5 pontjáról származó ammónia-oxidáló közösségek mintázata azt mutatja, hogy a fent említett két csoport előfordulásában itt is eltérések figyelhetők meg. Feltételezhető, hogy az oszlop alsóbb rétegeiben, ahol a nagy ammóniakoncentrációjú szennyvíz rátáplálása történik, az ilyen környezetet jobban tűrő szervezetek fordulnak elő, domináns a *Nitrosomonas*-okra jellemző csúcs, a *Nitrospira*-k azonban az oszlop közepétől jelennek meg. Valószínűleg az ammóniakoncentráció itt már lecsökken olyan szintre, hogy az a *Nitrospira*-k elterjedésének is kedvező.

Az oszlop középső rétegéből vett biofilm minták AmoA T-RFLP mintázatának változását a kísérlet 4 időpontjában a 46. ábrában mutatjuk be. Az ammónia-oxidálók közösség-összetételének változása az előbbieken elmondottakat jól tükrözi, legalábbis abban az értelemben, hogy a *Nitrospira* nemzetség képviselője csak a kisebb ammónia terhelések esetében mutatható ki.

A nitrifikáció második lépése a NO₂⁻ oxidációja NO₃⁻-á, ezt a nitrit-oxidáló szervezetek végzik. Ezt a csoportot eltérő filogenetikai eredetű fajok alkotják, ezért olyan molekuláris marker, amely rájuk nézve csoportszinten specifikus lenne, nem található. A 16S rRNS génjén belül kerestünk olyan szakaszokat, amelyek főleg a nitrit-oxidálókra jellemzőek, és lehetőleg minél kevesebb az egyéb felszaporítható csoportok száma. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy szennyvíztisztító rendszerekben két domináns nitrit-oxidáló csoport fordul elő: ezek a

Nitrospira, illetve a *Nitrobacter* nemzetségek tagjai. A *Nitrospira*-k egy nitrit-oxidáló közösségben akkor jelennek meg, ha kis nitrit- és oxigén koncentráció van, a *Nitrobacter*-ek ezzel szemben sikerebben kolonizálják a nagy nitrit-, illetve oxigéntartalmú közeget.

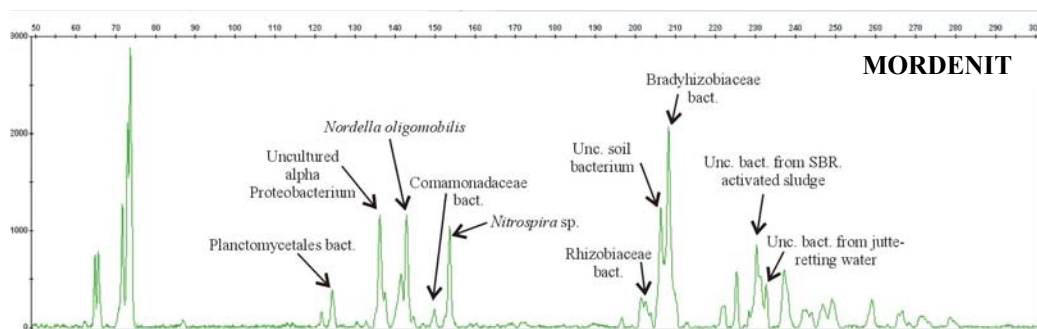


46. ábra. Az ammónia-oxidálók diverzitása az oszlop egyes rétegeiben.

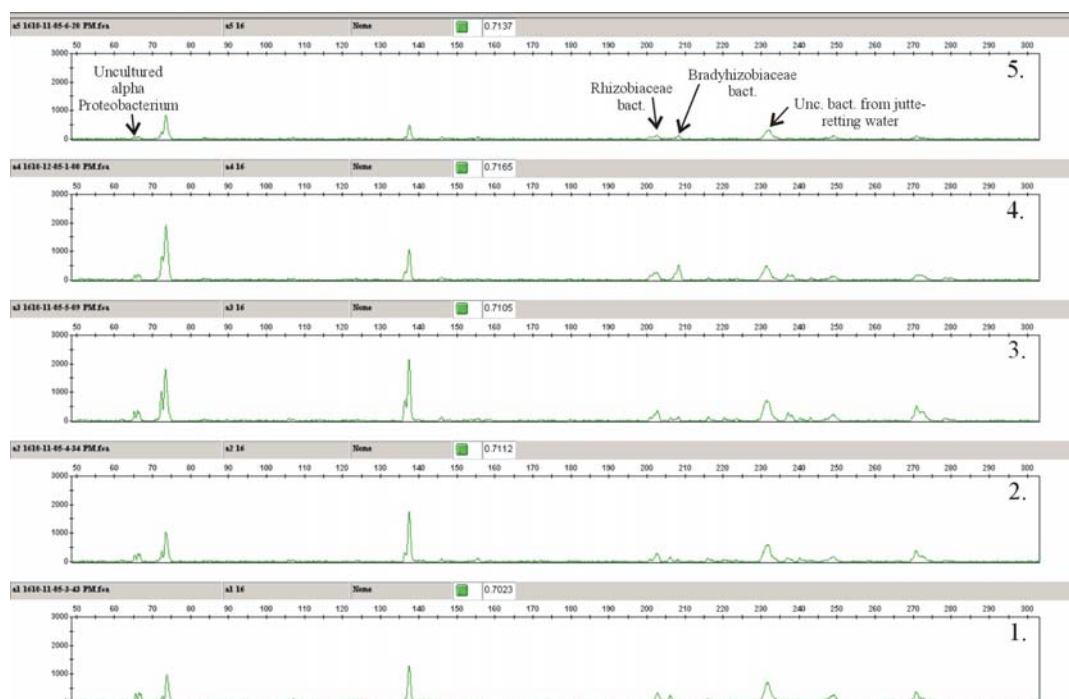
Első lépésként „szemi specifikus” primerek alkalmazásával próbáltuk kimutatni nitrit-oxidálók jelenlétét. A kapott PCR termékeket klónoztuk, T-RFLP segítségével klónkönyvtárat készítettünk és bázissorrend elemzést végeztünk. A *Nitrospira*-k esetében nem volt sikeres, nem kaptunk értékelhető eredményt. A *Nitrobacter* specifikus primer segítségével a 16. táblázatban összefoglalt szervezeteket azonosítottuk. A 16S rDNS bázissorrend nagyfokú hasonlósága (homológia) miatt egyes esetekben a *Nitrobacter* nemzetséggel közel rokon, szintén a Bradyrhizobiaceae családba tartozó szervezeteket is sikerült azonosítani az adatbázis alapján.

Nitrobacter specifikus primer		
Mintavételi réteg	Legközelebbi rokon taxon	bázissorrend hossz / hasonlóság (%)
5. Tisztított víz	<i>Nb. vulgaris</i>	610 / 99
4. Réteg	<i>Nb. vulgaris</i>	607 / 99
3. Réteg	<i>Nb. vulgaris</i>	499 / 100
2. Réteg	Nitrit-oxidáló baktérium	129 / 99
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	129 / 99
	<i>Nb. winogradskyi</i>	124 / 100
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	581 / 100
	<i>Afipia lausannensis</i>	592 / 100
1. Befolyó szennyvíz	<i>Nb. vulgaris</i>	610 / 99

16. táblázat. A kísérleti nitrifikáló rendszer nitrit oxidáló közössége *Nitrobacter* szemi specifikus 16S rDNS klónozás és bázissorrend elemzés alapján.



47. ábra. A két hónapja üzemelő nitrifikáló kísérleti rendszer középső rétegének biofilm mikrobiótája 16S rDNA T-RFLP profilja. Az egyes T-RF-ek azonosítása klónozás és bázissorrend elemzés alapján történt. A nitrifikáló biofilmben ekkor már olyan nagy mennyiségben voltak jelen a *Nitrospira* fajok, hogy jól értékelhető csúcsot adtak. A *Nitrobacter* fajoknak csak közeli rokonait észleltük (pl. Bradyrhizobiaceae)



48. ábra. A két hónapja üzemelő nitrifikáló kísérleti oszlop *Nitrospira* nitrit oxidáló baktérium 16S rDNA nested PCR alapú T-RFLP mintázata. Jól látszik a *Nitrospira*-k mennyiségi változása a befolyó szennyvíztől (1.) a tisztított szennyvízig (5.).

A *Nitrospira* nemzetség képviselőinek kimutatásához újabb univerzális primerrel készült 16S rDNA klónkönyvtár elemzést készítettünk a két hónapja már üzemelő rendszer középrégiójának biofilmjéből. Ebben már feltehetőleg akkora csíraszámban voltak jelen, hogy rá tudtunk bukkanni a klónkönyvtár elemzése alapján és így a T-RFLP profilban is azonosítottuk (47. ábra). Ezen eredmények alapján egy nested PCR megközelítést állítottunk össze, amelyben először univerzális primerekkel amplifikáltunk, majd pedig *Nitrospira* szemi specifikus primerekkel. Ily módon lehetővé vált az oszlop *Nitrospira* dinamikájának ellenőrzése is (48.

ábra). Vagyis a kérdéses időpontban a *Nitrospira* sp. jelen volt a befolyó szennyvízben, mennyisége pedig az oszlop középrégiójában (3. réteg) volt a legnagyobb - amennyire ez két PCR-t követően - megállapítható. Feltehetően az oszlop középrégiójában volt ekkor a legintenzívebb nitrifikációs aktivitás, amit alátámaszt a *Nitrobacter* fajok tág spektruma a 2. rétegben. További elemzést igényel, hogy a *Nitrobacter* és *Nitrospira* fajok milyen ammónia oxidáló szervezetekkel kooperálnak és milyen lokális nitrit koncentrációkhoz adaptáltak.

V.3.3. A parti szűrésben résztvevő mikróbaközösségek elemzése molekuláris ujjlenyomat eljárások segítségével

A Fővárosi Vízművek Zrt. Dunakeszi déli határában kijelölt parti szűrésű kútjainak beszivárgó területén a szűrésben fontos szerepet játszó mikróbaközösségek összetételét vizsgáltuk a szűrőréteg első 1 méterén. A fizikai és kémiai vizsgálati eredményekből megállapítható a viszonylag nagy, de a mélységgel általában csökkenő oldott oxigén minden vízminta esetében. Ugyanakkor a víz végig aerált egészen a kútig, ahol az oldott oxigén tartalom 4-6 mg/L között változó. A kísérlet kezdetekor átlagosan 17 °C körüli vízhőmérsékletet a kísérlet végére 6 °C körüli értékre csökkent, legalábbis a vízáadó rétegek felső 1 m-ében. Vagyis egy mikrobiológiai szempontból átmeneti időszakban végeztünk elemzéseket. Eközben a 13. kút vízhőmérséklete csak 2-4 fokkal csökkent. A Duna víztől (pH 8,5 - 9,5) a kútvíz 0,5-0,8 egységnyi pH csökkenés tapasztalható. A Duna vízhozam növekedésével a pH nő, míg apadásakor, ill. kisvíznél a pH csökken. A vizsgálati periódusban a Duna víz kiváló minőségű volt a felszíni vízre vonatkozó kritériumok alapján a NO₃⁻ ion tartalmat kivéve, amely minden esetben meghaladta a határértéket. Ezen kívül az árvizes periódusokban (18. ábra) a KOI értéke erősen megnövekedett.

A rétegvíz minták pH, vezetőképesség értékei csak szűkebb intervallumon belül változnak, szinte helytől, időponttól függetlenül hibahatáron belül azonosak voltak. Keveset változott a minták keménysége, lúgossága és szerves szénvegyület (hidrogén-karbonát) tartalma, valamint 0,1 - 0,3 mg/L koncentráció intervallumon belülnek adódott reaktív foszfáttartalma. Stabílan 50 mg/L körüli volt a vizek szulfáttartalma. A nitrogén-formák közül ammónium-ion gyakorlatilag nem volt kimutatható, nitritet csak a két nagyvizes mintában találtunk. A nitrát ion tartalom kevésbé változott, jellemzően a rétegmélységgel csökkent. A KOI és a TOC értéke nagyvizes időszakokban a felszín közeli vízmintákban enyhén megnövekedett. A kútvíz minden alkalommal a mért paraméterek mindegyike alapján megfelelt az ivóvíz minőségével szemben támasztott követelményeknek (határértékeknek). A kútvíz minősége azonban feltűnően eltért a rétegvíz mintákétól.

A víz- (Duna-, kút-, rétegvíz) és üledékmintákra vizsgált kémiai paraméterekre nyert adatok alapján a parti szűrés hatása részleteiben nem követhető pontosan nyomon. A rétegek közt a mintavételi mélységtől függő egyértelmű, sok komponensre együttesen érvényes koncentráció különbséget, azaz szűrő hatásra bekövetkező komponenstartalom csökkenést (gradiens) nem tudtunk kimutatni. A vizsgált kémiai paraméterek tekintetében úgy tűnik, mintha a Duna víz szűrése a kavicságy vékony, 1 - 2 cm-es felszíni rétegében történne. A mikrobiológiai eredmények ugyanakkor teljesen más képet tárnak elénk.

A vízhygiénés indikátor szervezetek (*E. coli*, kóliform, *Enterococcus*) száma a vizsgálat alatt a 13. kút vizében a detektálhatósági szint alatt volt. A vizsgálat időtartama alatt levonuló dunai árvíz a mederbe telepített kutak 10-40 cm rétegvizeiben a kóliform-szám szignifikáns emelkedését okozta, amely azonban az apadással egyidejűleg ismét csökkent. Ez azonban nem egyértelműen friss fekális eredetű, inkább egy - az árvízkor nem szokatlan - általános mikróbaszám emelkedésre utal, és jól korrelál az ammonifikálók és a heterotróf baktériumok 22 °C-on meghatározott csíraszámával. Az árasztásos terület kútjainak vizében kimutatható higiénés indikátor mikrobák száma az időben - viszonylag alacsony értékről indulva - némi ingadozással ugyan, de csökkenő tendenciát mutat. A csíraszám fluktuációja inkább a kísérleti területet időközben elárasztó természetes dunai árvíz számlájára írható.

A dunai kavicsminták felső 10 - 40 cm-es szelvényeinek biofilmjében mindhárom higiénés indikátor kimutatható volt. A mélyebben fekvő szelvények irányában azonban számuk gyorsan a kimutatási szint alá csökkent, ezt számottevően az árvíz sem befolyásolta. A parti kavicsminták biofilmje az elárasztás folyamán, a kóliform-szám 70 cm-es kavicsszelvényben tapasztalt dúsulását kivéve hasonló tendenciát mutattak. A dúsulás oka valószínűleg a finomabb szemcsék aránynövekedésével lehet kapcsolatos. A terület geológiai jellemezése szempontjából lényeges megjegyezni ugyanis, hogy (száraz szitálásos szemcseméret elemzés alapján) 40 és 70 cm között a finomabb homok frakció ($< 0,125$ mm) dúsulása jellemző.

Az ammonifikáló szervezetek csíraszama kiinduláskor a dunai kavicsszelvény biofilm 30 - 40 cm-es szakaszán mutatott maximumot. Az árvíz során az ammonifikálók csíraszama 70 - 100 cm-en mutatta a maximumot. Az elárasztott területen az ammonifikációs zóna az idő előrehaladtával a parti kavicsszelvény felsőbb rétegeiből 60 - 70 cm-re húzódott le. Ezek alapján feltételezhető, hogy a kavicságy 30 - 70 cm-es mélységében a biofilmben ammonifikációs zóna van. Megjegyezzük, hogy ebben a zónában volt a legnagyobb a TOC értéke is.

A denitrifikációs aktivitást tekintve a kavicsminták biofilm közössége nem mutatott szignifikáns zonalitást. Feltételezhető, hogy a denitrifikálók előfordulása sokkal inkább mo-

zaikos jellegű, esetleg lokális anoxiás gócokra korlátozódik. Mindazonáltal a november 8-án vett (árvízi) minták minden rétegben egy nagyságrenddel nagyobbak a denitrifikáló csíraszámot illetően. A figyelő-kutak vizében azonban a dunai minták 40 - 70 cm-én csíraszám növekedés mutatható ki. Ez tekinthető annak a zónának, ahol a finomszemcsés kavics összlet és a nagyobb TOC miatt a denitrifikációs foltok a leggyakoribbak. Az elárasztott terület esetében jól megfigyelhető a denitrifikációs zóna kialakulása, ami az elárasztást követő héten a 100 cm-es zónában alakult ki és itt stabilizálódott. A felsőbb rétegekben tapasztalható változások a levonuló árvíz zavaró hatásának köszönhetőek. Itt az árasztás a felszínről az elhalt szerves anyagot (nagyobb TOC) a mélybe moshatta, és ez lehetett felelős a jelesebb denitrifikáló számért.

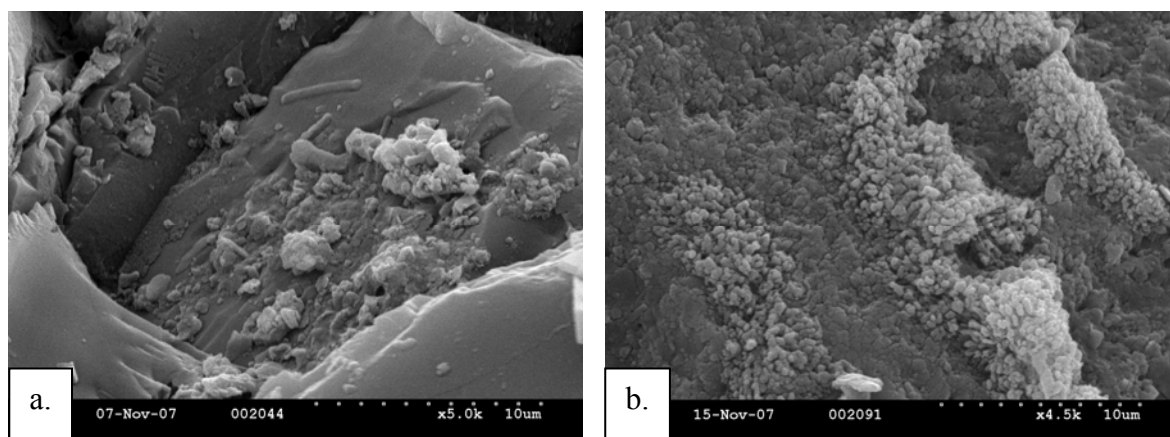
A nitrifikáló szervezetek jellemzően kis tenyésztető csíraszámokkal vannak elsősorban a felsőbb szelvényekben jelen, de induláskor szignifikáns különbség volt kimutatható a parti és a dunai kavicsszelvények között. Ez valószínűleg a parti kavics felsőbb rétegeinek jobb át-
szellőzőségével (és kisebb szerves anyag tartalmával) magyarázható. Az ammóniaoxidálók száma a parton, az elárasztás során előbb a mélyebb kavicsszelvényekben, majd a felsőbb kavicsszelvények rétegvizeiben csökkent a kimutathatósági határ alá. Szemben a dunai kavicsszelvények és rétegvizek adataival az árasztásos területen a kísérlet végére nem volt kimutatható ammónia-oxidáló szervezet. Megjegyezzük, hogy a rétegekben a NO_3^- tartalom ekkor volt a legcsekélyebb. A nitrifikáló aktivitás hőmérséklet csökkenéssel párhuzamos drasztikus csökkenése más rendszerekből jól ismert, de a Duna esetében is kimutatták (Alföldi és mtsai, 1995; Salem, 1997). Az eddigi vizsgálatok szerint csupán az enzimműködés gátlódik (hőmérséklet hatásra, ill. nitrifikáció gátló anyagok dúsulása miatt). Ezen eredmények a nitrifikálók sejtszám csökkenését is jelzik.

Egyik vizsgált *víz minta* esetén sem mutattunk ki szulfátredukáló csíraszámot. A kavicsfelületi biofilmben is nagyon csekély a szulfátredukálók mennyisége (maximum $2,5 \times 10^4$ MPN g^{-1}).

A kavicsfelszín mikroba borítottságát nézve jelentős különbségeket tapasztaltunk a parti kiszáradt kavics, valamint a vízzel elárasztott, illetve a folyó medréből származó minták között (49. ábra). Az árasztásra kijelölt mintavételi pontról a kísérleti medencéből 0 - 70 cm-ről származó kavicsmintákra jellemző, hogy baktériumokkal kevésbé kolonizált, sok esetben teljesen kiszáradt a biofilm tömeg. E mintavételi hely legmélyebb pontjáról (90 - 100 cm) származó kavicsokon viszont néhol már összefüggő baktérium bevonat is megfigyelhető volt, ami jelzi, hogy ezen mélységben kellő nedvességtartalom uralkodhatott a felső, kiszáradt zó-

nákhoz képest. A tartósan vízzel fedett dunai kavicságy felső zónájából származó kavicsok felszínén halmokat képző, nyálkába ágyazott mikroorganizmus tömegek tűnnek fel.

A 13. kút vize mutatta minden alkalommal a legkisebb AODC sejtszám értékeket, két minta esetében még számolható sem volt. A sejtszámok radikálisan nem változtak a mintavételek során, a legnagyobb értékkel jellemezhető időpontok egy-egy kisebb árvíz tetőzésével estek egybe. A rétegvizek esetében is ekkor kaptuk a legnagyobb értékeket. A Duna víztől a mintavételi mélységgel csökkennek az AODC sejtszámok, bár a csökkenés általában nem nagyobb 1 nagyságrendnél, még 1 m-es mélység esetén sem. Sejtszám csökkenést tapasztaltunk a mintavételi idő előre haladtával is (ugyanazokat a mintahelyeket figyelembe véve). Ezt a vízhőfok erőteljes csökkenésével magyarázhatjuk. Általános megfigyelés, hogy a tenyésztési vizsgálatok alapján a pszihrofil szervezetek száma egy adott közegben csekélyebb, mint a mezofileké.

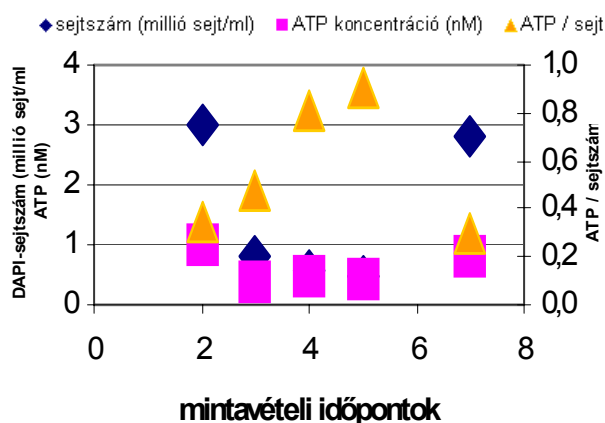


49. ábra. a. A parton elárasztott terület 90-100 cm mélységű zónájából származó kavicsmintáról készített SEM felvétel (október 15.). A (minden bizonnyal) kvarc tört felszínén szoliter mikróbák és mikrokolóniák egyaránt láthatók. b. A Dunából, a kavicságy 90-100 cm mélységű zónájából származó kavicsmintáról készített SEM felvételen (október 15.) homogén, vastag biofilm bevonat látható.

A Duna meder-üledékében az intersticiális víz ATP-mennyisége a mélységgel arányosan csökkent. A parti, kísérleti rendszerben a rétegek közül a 40 cm mélységűnek volt átlagosan a legnagyobb ATP koncentrációja. A kísérleti idő előrehaladtával az ATP mennyisége csökkent. Az ATP szintek változásai korrelálnak a direkt sejtszámolás eredményeivel. Ugyanakkor, ha a sejtszám és az ATP értékeket nem önmagukban értékeljük, hanem meghatározzuk a sejtek egyfajta „energia töltöttségét”, nagyon érdekes jelenséget figyelhetünk meg. Valamennyi vízminta (Duna, ill. kísérleti rendszer megfelelő mélységei) esetében igaz az, amit a 50. ábrán mutatunk be. Bár mind a sejtszám, mind az ATP koncentráció görbéje (azo-

nos mélységet tekintve) hasonló lefutású, a sejtszámmal osztott ATP mennyiség a mintavételi időpontok előrehaladtával növekedést mutat mind a Duna-meder, mind a kísérleti rendszer esetén. (Kivételt képez ez alól az utolsó árvízi mintavétel a kísérleti rendszerben.) Ennek oka valószínűleg a sejtek aktivitásában kereshető, vagyis a méréseink során egyfajta őszi „hideg-adaptációs” periódust követtünk végig. A kutatás kezdetekor zömében mezofil közösségek alakultak pszihrofillé. Míg az előzőek aktivitása 16 °C-on már gátlódott, utóbbiak működése a 6 °C körüli hőfokokon hatékonyabb, erőteljesebb lehetett.

Az utolsó mintában mind a sejtszámok, mind az ATP mennyisége növekedett az árvíz hatására, ugyanakkor az ATP sejtenkénti mennyisége lecsökken. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy az ott élő mikrobiális közösségre egyszerre több tényező is hatást gyakorolt: a szerves anyag terhelés növekedése, a csekély mértékű oldott oxigén szint csökkenés stb.

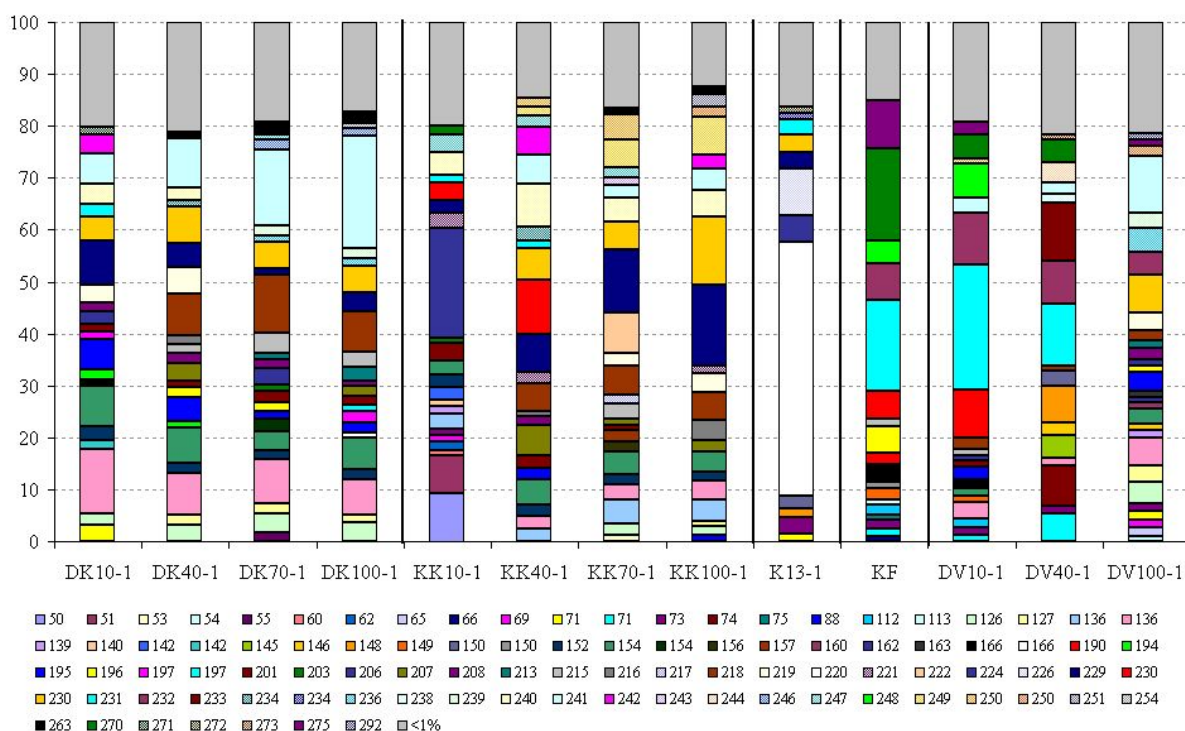


50. ábra. Az elárasztott dunai kísérleti rendszer 40 cm-es mélységében a rétegvíz sejtszámának és ATP-mennyiségének, valamint a sejtszámmra vonatkoztatott ATP mennyiség értékének alakulása az időben.

Az első mintavétel fajspektrumának összegző eredményét az 51. ábrában mutatjuk be. Az egyes színekkel jelölt szervezetek közösségen belüli arányváltozásait szemügyre véve láthatjuk, hogy vannak a mélységgel növekvő arányban előfordulók (pl. dunai magminták, felül, világoskék), más szervezetek éppen ellenkezőleg a mélységgel csökkenő arányban korrelálnak (pl. dunai kútvíz, középső türkiz szín). Egy pillanat alatt feltűnik a 13-as kút különállása is, vagyis mikrobaközösségének az összes többi mintától eltérő volta. A Duna víz és a dunai kutak vize ugyanakkor – logikus módon – mintha hasonló volna egymáshoz. Valamennyi mintavétel mikrobiológiai eredményeit nem mutatjuk be és elemizzük részletesen, hanem az eredmények együttes értékelésére helyezzük a hangsúlyt.

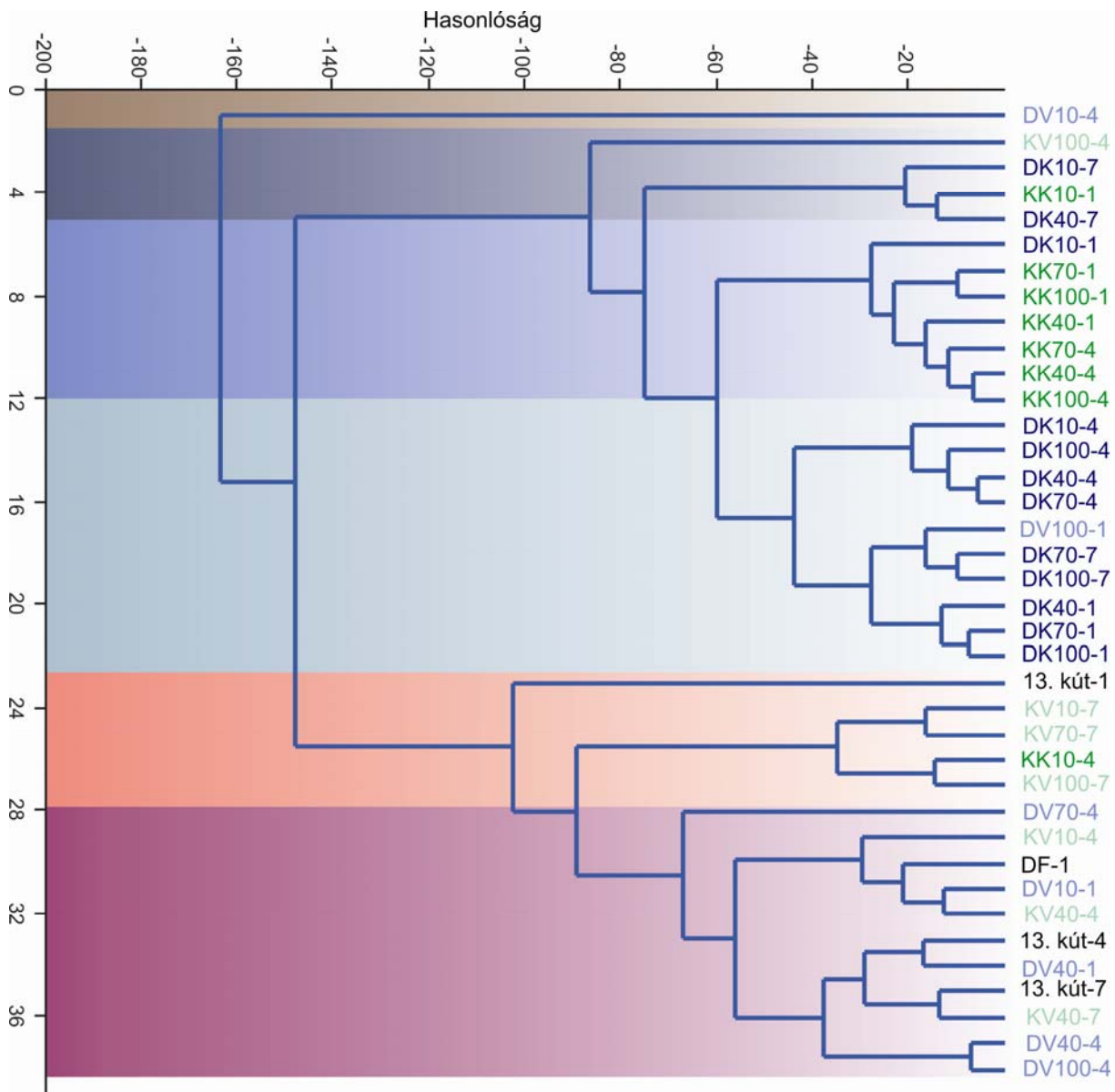
Az 1., 4. és 7. mintavételek együttes elemzése alapján (52. ábra) jól látható a víz- és magminták éles elkülönülése. A kútvíz minősége szempontjából a legfontosabb dolog viszont

a II/13-as csáposkút-minták „vándorlása” az ábrán. Míg az 1. időpontban élesen elválik a többi mintától, a továbbiakban folyamatosan változik, de mindvégig a nem túl mélyről származó vízmintákhoz hasonlít. Ha aprólékosan szemügyre vesszük az eredményeket az ábrán sok érdekes finom, továbbgondolkodásra készítő összefüggés fedhető fel. A kavics minták esetében pl. a Duna és a kísérleti rendszer elválik egymástól, még hozzá a folyamatosan elárasztott dunai minták átlag hasonlósága jóval nagyobb, mint a kísérleti rendszeré. A Dunai kavics 1-es és 4-es mintái külön csoportosulnak, a 7-es esetében a mélyebb rétegek tartanak csupán ezekkel, a felszíniek nem. Ellentétben a kavics biofilm minták „szabályos” viselkedésével a vizek jobban szórnak és csoportosulásuk nem annyira a mintavétellel korrelál, mint a mélységgel. Vagyis a biofilmben a vizsgált minták között kb. 4 hetes skálán közösségváltozás történt (pl. a hidegadaptáció miatt), ugyanakkor a víz mikrobaközösségeinél a felszíni víz mikrobiológiai állapotváltozása jelentősebb hatású. A kút vízminősége nagyobb mértékben a víz mikrobiológiai állapotához kötődik, semmint a biofilméhez. Megjegyezzük, hogy feltételezésünket megerősíti a mintákkal végzett főkomponens, valamint korrespondancia (53. ábra) elemzések eredménye is. Az a tény ugyanakkor,



51. ábra. Kavics és vízmintáink fajösszetétele az első mintavétel (2007. október 15.) alkalmával. Minden szín egy-egy faj, illetve genospéciesz jelenlétét, illetve közösségen belüli gyakoriságát mutatja. Az oszlopok tetején a szürke szín az 1 %-os gyakoriság (abundancia) alatt előforduló genotípusok összessége.

hogy a kút mikrobiótája különbözik mindegyik másik kavics és vízmintától azt jelzi, hogy még a felszíni 1 méteres réteget követően is fontos mikrobiológiai változások zajlanak a vízadó rétegekben.

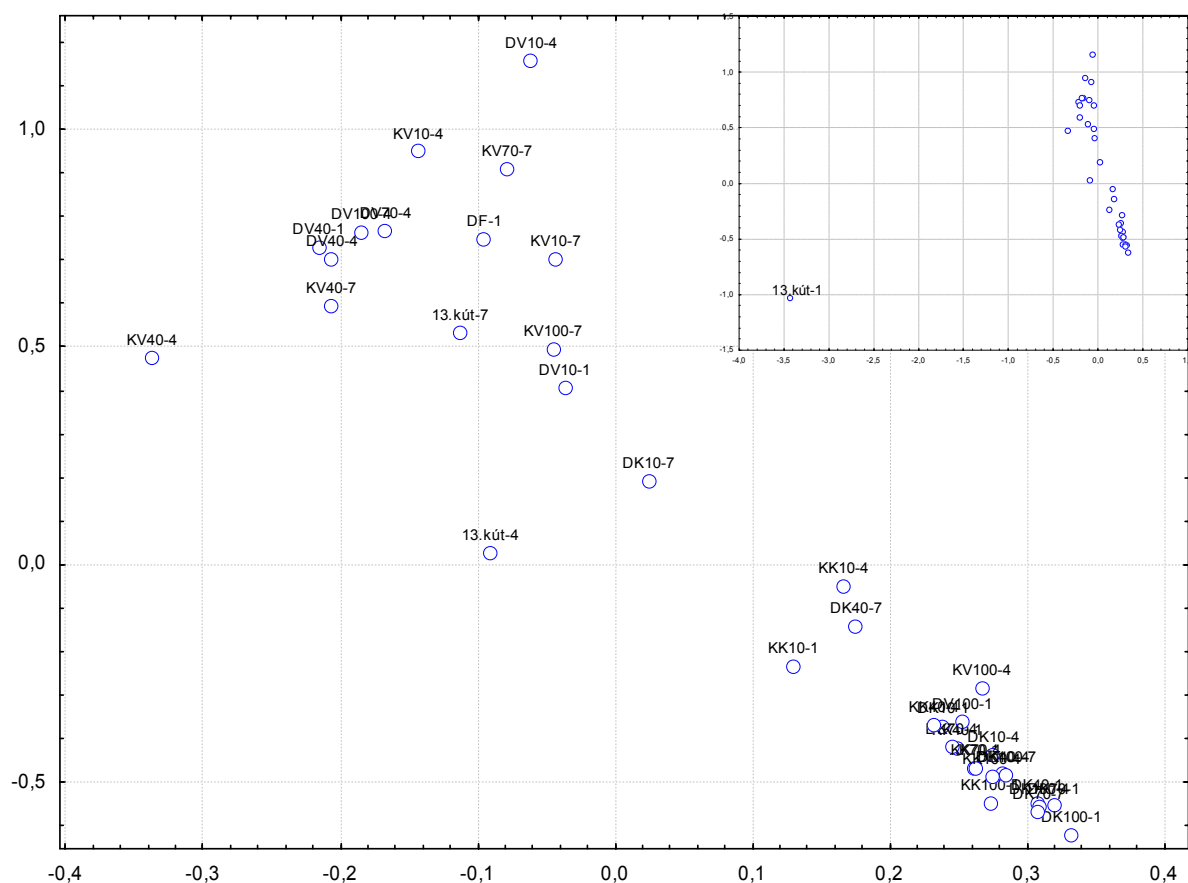


52. ábra. A parti szűrés elemzésére gyűjtött dunai mintáink (1., 4. és 7. mintavétel) T-RFLP segítségével elemzett baktériumközösségeinek együttes csoportelemzése.

A fizikai, kémiai és ujjenyomat eljárásokra alapuló mikrobiológiai vizsgálatok mellett mind az állandóan vízzel borított, mind pedig a kiszáradt kavics felső 5 cm-es rétegéből vett mintákból 16S rDNS alapú klónkönyvtár elemzést is végeztünk. A 400 (200 + 200) vizsgálatba vont klón mintegy 300 csoportot jelent. Vagyis a minták - amint az az 51. ábrából is sejthető - hihetetlenül diverzek, nagyon sok faj él együtt. A 17. és 18. táblázatban közölt

eredményekből legelőször is kiderül, hogy nagyon sok a tudományra nézve új szervezet. A nemzetségnévvel megjelölt klónok is alkalmanként nagyon távol állnak a legközelebbi rokonaiktól, még nemzetségszintű megfeleltetést sem téve lehetővé. Inkább a nemzetségek, családok, vagy főbb leszármazási vonalak hordanak pontos információt. Ezek zöme jól beleillik a vizsgált vízi környezetbe.

A Dunából vett mintában jellemezőek a proteobaktériumok (vagyis a Gram-negatív szervezetek), míg a száraz kavics esetében a Gram-pozitívak aránya 60 % feletti. A legvalószínűbb ok a kiszáradás. A kiszáritás hatására a kevésbé rezisztens Gram-negatívok elpusztulnak, és a mintában elsősorban a spóráképző - így ellenálló - szervezetek dominálnak. Ilyenek (18. táblázat) a *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Brevibacillus*, *Atopobium*, *Sanguibacter* nemzetségek képviselői, de kitartó képletei lehetnek Gram-negatív, pl. *Flavobacterium*, *Planctomyces* rokonsági körbe tartozó baktériumoknak is.



53. ábra. A parti szűrés elemzésére gyűjtött dunai mintáink (1., 4. és 7. mintavétel) T-RFLP mintázatainak korrespondencia elemzése. A jobb felső sarokban látható a teljes diagram, amelyből nagyítottuk a 13kút-1 minta kivételével a mintákat tartalmazó részt

Ha szemügyre vesszük a DK klónkönyvtár tagjait, mindenekelőtt is feltűnő, hogy mind nitrifikálók, mind pedig kénbaktériumok megjelennek a mintában. Hasonló módon jellemzőek a metilótróf és H₂ autotróf szervezetek (pl. *Sphingomonas*, *Methylibium*). Ezek a biofilmek jellegzetes tagjai vizekben, mert a biofilm mélyebb rétegeiben „egy szén” vegyületek (metilaminok, metántiolok), és H₂ alapú tápelem és energiátranszfer egyaránt jellemző. Természetesen megjelennek a vízben olyan „specialisták” is, amelyek nehezebben bontható szerves anyagok, akár mikroszennyezők hasznosításában jeleskedhetnek (a nemzetségek alapján: *oestradiolicum*, *aminoaromatica*, *petroleiphilum*). Ott vannak azután a denitrifikálók (pl. *Burkholderia*, *Halovibrio* nemzetségekből), sőt még szulfátredukáló is akad (*Desulfovibrio*). Végül, de nem utolsósorban fototróf szervezetek is megjelennek (*Heliobacteriaceae*). A száraz kavicsban a gyors, zimogén (r-stratégista) szervesanyagbontók domináltak, amelyek egyben az aerób biofilm alapvázát is alkotják sokszor fonalas szerveződésükkel.

Dunai kavicsminta klónkönyvtár (DK)		
Klón jele	Legközelebbi rokon, vagy típus törzs	Hasonlóság (%)
VA3R	<i>Sphingomonas</i> sp. - α -Proteobacterium	95
VA5F	Klón - <i>Acidithiobacillus</i> sp.- γ -Proteobacterium	87
VA6F	Klón - <i>Streptomyces</i> sp. - Actinobacteria	85
VA7F	Talaj baktérium klón - Acidobacteria	94
VA8F	Talaj baktérium klón - Nitrosomonadaceae - β -Proteobacterium	95
VB3F	<i>Aquabacterium</i> sp. klón - β -Proteobacterium	96
VB6F	Flexibacteraceae klón - Bacteroidetes	89
VB7F	Oxalobacteraceae klón - β -Proteobacterium	94
a3	<i>Sphingomonas jaspsi</i> - α -Proteobacterium	99,3
a5	Halomonadaceae - γ -Proteobacterium	93,63
a9	Burkholderiales - β -Proteobacterium	89,87
b3	<i>Methylibium petroleiphilum</i> - β -Proteobacterium	95,81
b7	Heliobacteriaceae, Clostridia	88,44
b8	<i>Methyloversatilis</i> sp. - β -Proteobacterium	91,09
c11	<i>Thiobacter</i> sp. - β -Proteobacterium	93,17
c12	<i>Nitrospira</i> sp. - Nitrospiraceae	92,14
c3	<i>Burkholderia</i> sp. - β -Proteobacterium	90,39
c5	Alteromonadaceae - γ -Proteobacterium	90,7
c8	<i>Cupriavidus</i> sp. - β -Proteobacterium	91,22
c9	<i>Thauera aminoaromatica</i> - β -Proteobacterium	95,49
e6	<i>Pigmentiphaga</i> sp. - β -Proteobacterium	90,37
f2	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i> - β -Proteobacterium	90,71
f5	<i>Stackebrandtia</i> sp. - Actinobacteria	84,69
f6	<i>Desulfovibrio</i> sp. - Delta-Proteobacterium	89,11

17. táblázat. A Duna kavics 0 - 5 cm-es mélységéből készült klónkönyvtár genospécieszei és genotípusai (1. mintavétel során vett minta).

Összegezve a tapasztalatokat valószínűsítjük, hogy az elárasztott partszakasz a vizsgált késő őszi periódusban két-három hét leforgása alatt veszi fel a dunai szűrőrétegre jellemző tulajdonságokat. A mikroszkópos sejtszám és az ATP mérési eredmények legfontosabb üzenete, hogy a vizsgálat ideje alatt a mikrobaközösségekben egyfajta hidegadaptáció zajlott le. A rétegvíz mikrobaközösségeit tekintve 0,5 m mélység körül megszűnik a Duna víz hatás az 1. mintavétel alkalmával és jobban jellemzővé válik az adott réteg biofilmjének hatása. Itt 1 m-es mélységben azonban még messze nem leljük meg a kútvíz jellemző biótáját. Ameny-

Száras felszíni kavicsminta (KK)		
Klón jele	Legközelebbi rokon vagy típusörzs	Hasonlóság (%)
SC11F	<i>Aquaspirillum</i> sp. - β -Proteobacterium	92
SD11F	<i>Variovorax</i> sp. - β -Proteobacterium	95
SE11F	Rhodocyclaceae klón - β -Proteobacterium	93
SF11F	Acidobacteria klón	93
SD12F	Chromatiaceae klón - γ -Proteobacterium	88
SF12F	Firmicutes klón	92
SH12F	Nitrosomonadaceae klón - β -Proteobacterium	95
d1	<i>Undibacterium pigrum</i> - β -Proteobacterium	96,25
d3	<i>Corynebacterium</i> sp. - Actinobacteria	85,22
f1	<i>Terrimonas</i> sp. - Flavobacteria	92,75
f2	<i>Sanguibacter</i> sp. - Actinobacteria	90,18
c3	<i>Brevibacillus</i> sp. - Bacilli	88,31
g1	<i>Schlesneria paludicola</i> - Planctomycetes	96,04
b3	<i>Heliobacterium</i> sp. - Clostridia	88,18
c2	<i>Atopobium</i> sp. - Actinobacteria	84,17
d2	<i>Clostridium</i> sp. - Clostridia	86,67
e2	<i>Thauera mechernichensis</i> - β -Proteobacterium	99,02

18. táblázat. A száraz felszíni parti kavics mintából (0 - 5 cm) készült klónkönyvtár genospécieszei és genotípusai (az 1. mintavétellel párhuzamosan vett minta).

nyiben együtt elemezzük a kavics és víz minták baktériumközösségeit, élesen szétválik a két minta: biofilm a biofilmmel, víz a vízzel csoportosul, még a kútvizet is beleértve. A kavics biofilm esetében a hasonlóságot illetően a rendező erőnek a mintavétel ideje tűnik, vagyis a biofilmben hosszabb távú változások a felszíni 1 m-en többé-kevésbé egyszerre zajlanak, a csekélyebb vízszint, vízminőség ingadozások nem tűnnek zavarónak. A vízminták esetében a mélység erősebb hatásának tűnik, vagyis a felsőbb kavicsrétegek vize a Duna vízzel együtt gyorsan megváltozik, szemben a mélyebb rétegekkel. Itt persze a vizsgált terület geológiai jellegzetességei (szemcseméret eloszlás) lényegesek lehetnek. Lényeges momentum, hogy a kútvíz mikrobióta domináns fajai a rétegvizekhez hasonlóak és a vizsgált 4 hetes skálán jelentősen eltérnek egymástól. A 13. kút 7-es mintája áll a legközelebb az egyes mintavétel

Duna felszíni vizéhez és a DV10-1 rétegvízhez. Mintha a kútvíz mikrobiótája 2 hónapos eltolódással követné a Duna mikróbaközösség változásait, annak ellenére, hogy a víz beszivárgási ideje a kérdéses helyszínen csupán pár nap.

V.4. A nemtenyésztéses eljárások hibaforrásai

Akárcsak a tenyésztéses eljárások, a nemtenyésztéses diverzitásvizsgálati módszerek is minden egyes lépésükben hibákkal terheltek. Az ezzel kapcsolatos elemzések köréből területre világítunk rá mélyebben. Az első a nukleinsav sokszorozás - szaporítás leggyakrabban alkalmazott eljárása a PCR. Másodikként egy ujjlenyomat eljárás a DGGE felbontási tulajdonságait elemezzük.

V.4.1. A primerhibák, a hibridizációs hőfok és a PCR ciklusszám hatása a 16 / 18S rRNS génre alapozott bakteriális közösség elemzésekben

A környezeti mintákból kivont DNS-ből PCR segítségével felszaporított 16S rDNS-re alapozott molekuláris közösségszerkezet vizsgálat hihetetlenül népszerűvé vált. Kétségtelenül felfedi azt a rejtőzködő diverzitást, amely a hagyományos tenyésztésen alapuló módszerek alkalmazásával rejtve marad (Hugenholtz és mtsai, 1998). Áttekintve az ilyen vizsgálatokat még azt is megállapíthatjuk, hogy eredményeink jellegzetesebbek, jobban megközelítik az elvárásokat a közösségszerkezet tekintetében, mint a tenyésztésre alapozott munkák eredményei. A szokásos nemtenyésztéses eljárás során a környezeti mintából kivonat nukleinsavakból a PCR során ún. „univerzális” primerekkel amplifikálunk. Az univerzális kifejezés jelen esetben arra utal, hogy a primerek az rDNS nagyon konzervatív régióihoz kötnek, ezáltal filogenetikai értelemben a legtagabb taxon csoportokat célozzuk meg. A heterogén PCR terméket azután vagy klónozás és bázissorrend elemzésnek vetjük alá, vagy pedig különböző elektroforetikus technikákkal vizsgáljuk (pl. DGGE, Muyzer és Smalla, 1998; SSCP, Schwieger és Tebbe, 1998), esetleg valamilyen restrikciós elemzésre alapozott technika segítségével (pl. T-RFLP; Weidner és mtsai, 1996; Marsch, 1999). Az a feltételezés azonban, hogy a közösségekben számarányát tekintve fontos, domináns baktériumokat a 16S rRNS génkönyvtárakban domináns klónok fogják képviselni, vagy pedig a molekuláris ujjlenyomat technikákban ezeké lesz a legerősebb sáv - amint láttuk - aligha garantálható. A molekuláris megközelítés valamennyi lépése hibákkal, tévedésekkel terhelt (von Wintzingenrode és mtsai, 1997). Úgy gondoljuk, hogy a különböző nukleinsav kivonási technikák kombinálásával megelőzzük a sejtlízis hatásfokában kimutatott különbségeket (Frostegaard és mtsai, 1999). Ugyanakkor a multitemplát PCR mennyiségi viszonyait ma még alig ismerjük. A fő gondot

talán az jelenti, hogy a PCR paraméterek megválasztásánál (nem közösségi vizsgálatok) eddig mindenki arra törekedett, hogy egy bizonyos speciális PCR termék nagymennyiségű előállítását érje el és ezzel pontosan a templát/termék arányok torzítását erősítik, ahelyett, hogy ezen arányok megtartására törekednének.

Az „univerzális” primerek degeneráltsága (vagyis kotyogása, hibái) - a kötési energiák különbségei révén - a feltételezett hibáknak biztos forrásai (Polz és Cavanaugh, 1998; Lueders és Friedrich, 2003). Márpedig precízen illeszkedő „univerzális” primer elvi okokból sem tervezhető (Schmalenberger és mtsai, 2001; Baker és mtsai, 2003), mert egy-egy nukleotidra vonatkozó variáció (single nucleotide polymorphism) még az evolúciónárisan legkonzerváltabb 16S rRNS régiókban is előfordulhat (ha nagyon ritkán is). A preferenciális amplifikáció jelenségét egyes 16S rDNS bázissorrendek esetében megfigyelték már (Reysenbach és mtsai, 1992), mégis ismert összetételű PCR templát keverékekkel nem elemezték a PCR paraméterek közsöszszerkezet torzító hatását. A szelektív amplifikációt illetően a hibridizációs hőmérséklet (Ishii és Fukui, 2001), valamint a templát koncentráció és a ciklusszám (Chandler és mtsai, 1997; Dohrmann és Tebbe, 2004) többek véleménye szerint fontos tényező lehet. Azt is megjósolták, hogy a genomi tulajdonságok, így elsősorban a genomméret, a 16S rRNS gének kópiaszáma, valamint G+C aránya lényeges lehet a PCR termék arányok tekintetében (Farrelly és mtsai, 1995; Crosby és Criddle, 2003; Klappenbach és mtsai, 2000). Suzuki és Giovanoni (1996) (valamint Suzuki és mtsai, 1998) megfigyelték, hogy a PCR ciklusszám is befolyásolja a templát/termék arányt a 16S rDNS szaporítás esetében. A jelenség magyarázatára matematikai modellt dolgoztak ki, amelyben azt vették figyelembe, hogy a PCR ciklusok primerkötődési hibridizációs lépéseiben a nagyobb koncentrációban jelenlevő termékmolekulák egymással hibridizálnak és így gátolják a primerek templáthoz kötődését. Más kutatók utóbb e jelenséget vizsgálva nem tudtak ciklusszámhoz köthető hibát kimutatni (Osborn és mtsai, 2000; Lueders és Friedrich, 2003; Acinas és mtsai, 2005).

E problémakör felderítésére pontosan ismert genomi templát alkalmazásával és két széles körben használt forward (27F [Lane, 1991]; 63F [Marchesi és mtsai, 1998]) és csupán egy reverz (1387R [Marchesi és mtsai, 1998]) primer segítségével próbálkoztunk. Templát keverékek felhasználásával részletes, statisztikai elemzéssel alátámasztott kísérleteket végeztünk a hibridizációs hőmérséklet és a ciklusszám hatásának elemzésére és figyelembe vettük a primerhibák hatását is. A levont következtetések hasznát pedig egy környezeti bakteriológiai közösség vizsgálat (gyékény rizoplán) elemzésével be is mutatjuk.

Terminális fluoreszcens jelzéssel ellátott PCR termékeket pontosan 1:1 arányban kevertünk majd restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztettük. Ezt a terméket először a kí-

sérletekben használt kapilláris elektroforézis validálására használtuk a T-RF-ek csúcsmagasság és csúcs alatti terület értékeit ellenőrizve. A legtöbb esetben a bemért arányokat kaptuk a T-RFLP kromatogramok kiértékelése után. Az ismétlések szórása ($SD = 1 \pm 0,1$) is elfogadható volt (54. ábra). Ugyanakkor a csúcsmagasság értékek aránya jelentősen eltért az eredeti (1 : 1) koncentráció-aránytól amennyiben a T-RF hosszak > 50 bp értékkel különböztek. A csúcs alatti területek aránya még ilyen esetekben is csak kissé tért el az eredeti koncentráció aránytól. A bemért és ez alapján várt aránytól való eltérés az elválasztásra kerülő fragmensek hosszkülönbségétől erősen függött, ugyanakkor a T-RF-ek aktuális mérete nem befolyásolta a torzulást. A torzulás azzal függ össze, hogy a kapilláris elektroforézisre a nagyobb méretű fragmensek esetében egyfajta "csúcslaposodás" jellemző (vagyis kisebb és szélesebb csúcsokat kapunk). Ez a kapilláris elektroforézis eljárás saját belső jellegzetessége. Ez indokolja, hogy a mikrobiális diverzitás elemzések esetében a csúcs alatti területek értékét kell figyelembe venni és nem a csúcsmagasság értékeket (ha kiértékelésünket kapilláris elektroforézissel végezzük). Lueders és Friedrich (2003) agar-gél elektroforetikus T-RF szeparálásnál éppen ennek ellenkezőjét ajánlja. Vagyis a molekuláris ujjlenyomat eljárások eredményeinek kiértékelése során figyelembe kell venni az alkalmazott elválasztási módszert.

A primer illeszkedési hibák hatását két forward primerrel elemeztük (27F és 63F). A 27F esetében mindegyik cél szekvencia pontosan illeszkedett, míg a 63F esetében az 5' vég közelében három hiba is volt a *Bacillus* törzseknél. A reverz primer valamennyi törzs cél DNS-éhez tökéletesen illeszkedett (19. táblázat). Az illeszkedési hibák hatásának elemzéséhez a különböző törzsekből izolált DNS-t azonos arányban elegyítettük, majd a különböző primerpárok használatával PCR-t végeztünk (TET-27F és 1387R, TET-63F és 1387R). Ahogy az várható volt, a 63F primer használata esetén az *Aeromonas hydrophila* és a *Pseudomonas fluorescens* preferenciális amplifikációját észleltük mindkét *Bacillus* törzsszel szemben. A 27F primer alkalmazása során ezt a jelenséget nem tapasztaltuk. Ha a nem pontosan illeszkedő templátot a pontosan illeszkedőhöz viszonyítva kisebb arányban mértük be (1 : 10) csak a pontosan illeszkedő primer "PCR termékét" észlelhettük. Ez azt jelenti, hogy közösségi DNS-re alapozott PCR esetén még akár a közösség lényeges fajait sem fogjuk esetleg kimutatni a preferenciális amplifikáció hatására. További kísérleteink ezért irányultak a PCR paraméterek vizsgálatára, vajon ezek kellő megválasztásával csökkenthetjük-e ezt a hibát?

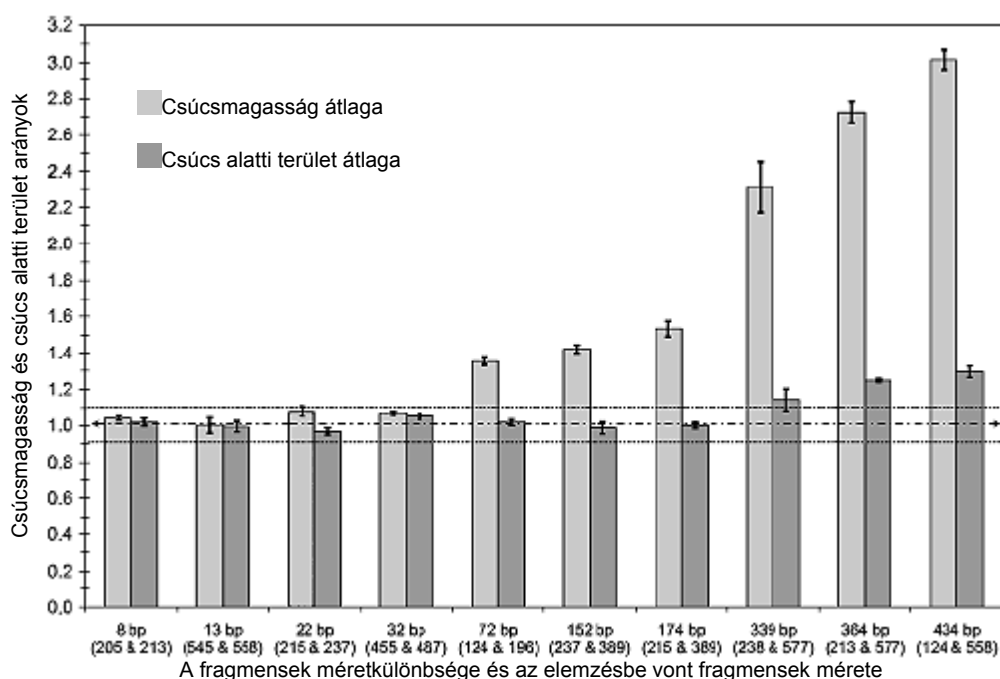
A primer hibridizációs lépés, vagyis a primer megkötődése a templát DNS-en a PCR sikerének, pontosságának talán leglényegesebb tényezője. A puffer kémiai összetétele (PCR segítő [enhanszer] molekulák, oldószerek), a primer koncentráció, a Mg^{2+} ion koncentrációja,

a kötődési hőmérséklet mind lényegesek (Markoulatos és mtsai, 2002). Munkánkban ez utóbbi hatását elemeztük, hiszen a PCR optimalizálás folyamatában talán ennek a hatása a legmarkánsabb.

Mind pontosan illeszkedő, mind pedig illeszkedési hibás primerekkel végeztünk PCR reakciókat, miközben változtattuk a kötődési hőmérsékletet (47 és 61 °C között). Az 55.a. ábrán az *A. hydrophila* és a *B. subtilis* pár 1 : 1 arányú keverékének a hőmérsékleti gradiens PCR eredményeit mutatjuk be. A PCR terméket a *Hin6I* restrikciós enzimmel emésztettük, amely 25 bázispárnyi hosszkülönbségű T-RF-eket ad. Ez a méretkülönbség az 54. ábra alapján még a kapilláris elektroforézis 5 % hibahatárán belüli eredményt adja. Az eredeti 1 : 1 aránytól a hőmérséklet emelésével a termékarány szinte exponenciálisan változva tért el az illeszkedési hibás primer esetén. Megjegyezzük, hogy az ismétlések szórás értéke meglehetősen nagy volt a nagy hőmérsékleteken, míg kisebb hőfokon mind az arányok, mind az ismétlések hibája megközelítette az elvártat. A pontosan illeszkedő primer esetében ez a fajta aránytorzulás nem volt észlelhető még a legnagyobb hőfokokon sem. Érdekes megjegyezni, hogy a kis hőfokon végzett PCR-ek esetében nem fordult elő ez az aránytorzulás sem a pontosan illeszkedő, sem a hibás esetben.

A *P. fluorescens* és *B. cereus* törzspár DNS keveréke esetében hasonló eredményt kaptunk függetlenül attól, hogy milyen restrikciós enzimet használtunk (55.b. ábra). 52 °C alatti hőmérsékleten az illeszkedési hibás PCR azonos eredményt adott a pontos illeszkedésével, míg a feletti hőfokok esetén a torzulás mértéke szinte exponenciálisan nőtt az illeszkedési hibás PCR-nél. Meg kell jegyezzük ugyanakkor, hogy hiába különbözött az egyes törzsek 16S rDNS operon száma ez a templát differencia nem tükröződött a kis hőmérsékleten végzett PCR-ek termékarányában (20. táblázat). Ez feltehetően más, a primerektől független tényezőkre vezethető vissza (Fareilly és mtsai, 1995; Hansen és mtsai, 1988). Teljesen nyilvánvaló tehát az 55.b. ábra üzenete: a genomi különbségeknél sokkal jelentősebb a multitemplát PCR esetében az illeszkedési hibák megléte. Az *Aeromonas hydrophila* / *Pseudomonas fluorescens* pontosan illeszkedő párok esetén a hőmérséklet megváltoztatása nem torzította a PCR termék arányt, akár a 63F, akár a 27F primereket is használtuk.

A primerkötődési hőfoknak a multitemplát PCR termékarányaira gyakorolt hatását (bár másik „univerzális” primerek alkalmazásával) a DGGE ujjenyomat módszer esetében már korábban kimutatták. Ishii és Fukui (2001) nagyobb primerkötődési hőfokon preferenciális amplifikációt és a közösségi mintázat egyszerűsödését, szegényedését tapasztalta. Hongoh és mtsai (2003) a 63F - 1389R primer párok alkalmazásával végzett

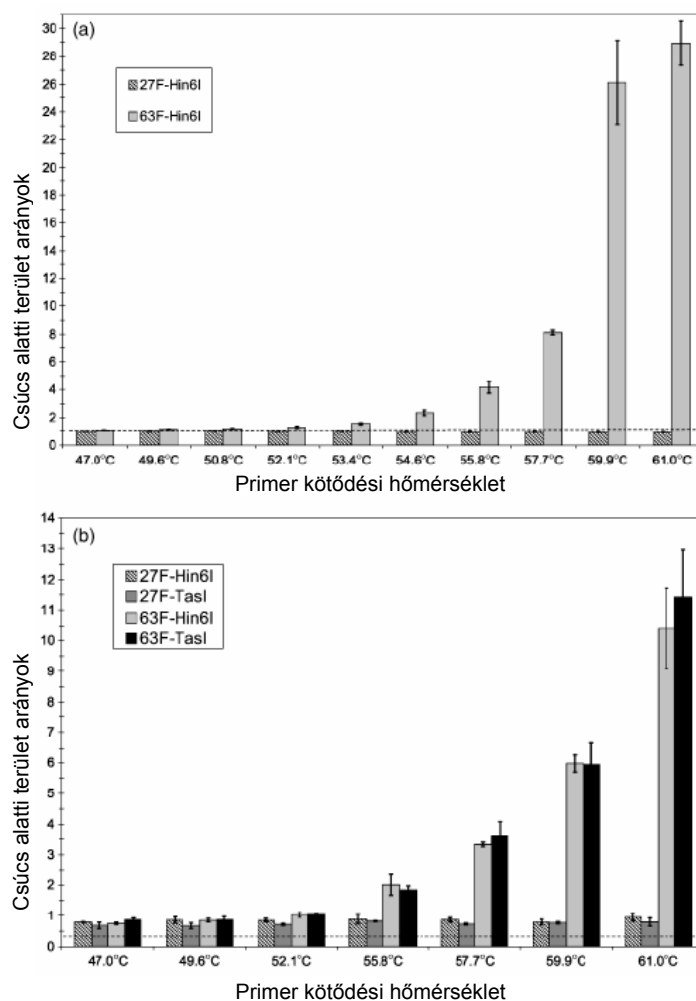


54. ábra. A csúcsmagasság és csúcs alatti terület arányok függése a különböző T-RF párok méretkülönbségétől. Tisztított PCR termékeket 1:1 arányban kevertünk, majd különböző restrikciós enzimekkel (*Hin*6I, *Tas*I, *Bsh*1236I, *Csp*6I) emésztettük. A nyert arányoknak az 1.0 értéket kellene megközelíteniük (---). A folyamatos vonalak a még elfogadható elérést jelölik ($1 \pm 0,1$). A rövidebb fragmens esetén kapott értékeket osztottuk a hosszabbéval. A vízszintes tengelyen mind a méretkülönbséget, mind pedig a vizsgált T-RF hosszakat feltüntettük. A hibavonalakat három független kísérlet (PCR) és három párhuzamos T-RFLP futás eredményeiből számítottuk.

TET-27F-primer	5'	AGA	GTT	TGA	TCM*	TGG	CTC	AG	3'
AH	5'	AGA	GTT	TGA	TCC	TGG	CTC	AG	3'
BC	5'	AGA	GTT	TGA	TCC	TGG	CTC	AG	3'
BS	5'	AGA	GTT	TGA	TCC	TGG	CTC	AG	3'
PF	5'	AGA	GTT	TGA	TCC	TGG	CTC	AG	3'
TET-63F-primer	5'	CAG	GCC	TAA	CAC	ATG	CAA	GTC	3'
AH	5'	CAG	GCC	TAA	CAC	ATG	CAA	GTC	3'
BC	5'	CGT	GCC	TAA	TAC	ATG	CAA	GTC	3'
BS	5'	CGT	GCC	TAA	TAC	ATG	CAA	GTC	3'
PF	5'	CAG	GCC	TAA	CAC	ATG	CAA	GTC	3'
1387R primer	3'	CGG	AAC	ATG	TGW*	GGC	GGG	5'	
AH	5'	GCC	TTG	TAC	ACA	CCG	CCC	3'	
BC	5'	GCC	TTG	TAC	ACA	CCG	CCC	3'	
BS	5'	GCC	TTG	TAC	ACA	CCG	CCC	3'	
PF	5'	GCC	TTG	TAC	ACA	CCG	CCC	3'	

*M: A/C; W: A/T

19. táblázat. A 27F, 63F és 1387F „univerzális” primer illeszkedése az *Aeromonas hydrophila* (AH), a *Bacillus cereus* (BC), a *Bacillus subtilis* (BS) és a *Pseudomonas fluorescens* (PF) 16S rRNS gén megfelelő szakaszaihoz. A szürke kiemelések jelzik a 63F primer esetében a két *Bacillus* fajnál található hibákat. A 27F és az 1387F primerek illeszkedése tökéletes.



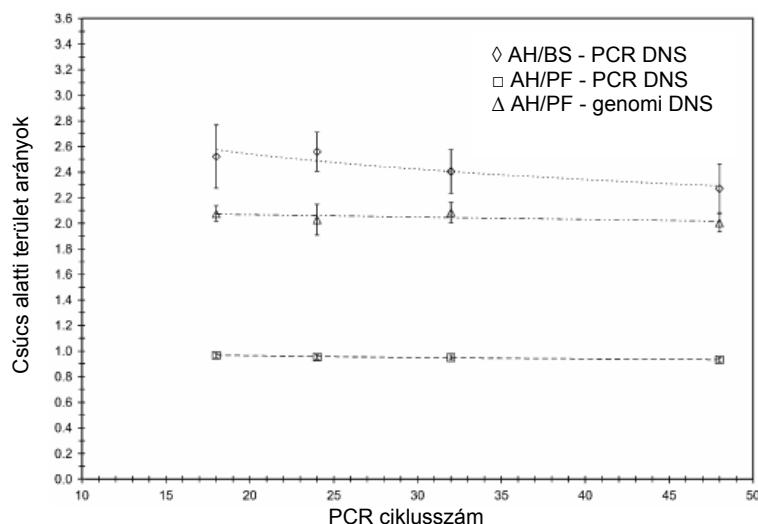
55. ábra. a. Az *Aeromonas hydrophila* (AH) és a *Bacillus subtilis* (BS) esetében eltérő primer kötődési hőmérsékletekkel nyert PCR termékarányok. Az AH csúcs alatti területét osztottuk a BS hozzá tartozó értékével. A T-RF-eket mind a 27F, mind pedig a 63F primerekkel készült PCR-ből a *Hin6I* enzim segítségével készítettük. b. A *Pseudomonas fluorescens* (PF) és a *Bacillus cereus* (BC) esetében eltérő primer kötődési hőmérsékletek esetén nyert PCR termékarányok. A T-RF-eket a 27F, és a 63F primerekkel készült PCR-ből egyszer a *Hin6I*, egyszer pedig a *TasI* enzimmel emésztettük. A beállított arányok alapján várt értékeket a szaggatott vonal jelzi (- - -). Mindig az AH, ill. PF csúcs alatti területét osztottuk a BS, ill. BC értékével. A hibavonalak méretét 3 független kísérlet és 3-3 párhuzamos T-RFLP futtatás eredményeiből számítottuk.

PCR/klónkönyvtár alapú diverzitás elemzésnél a filotípusok (filospécieszek) számának drasztikus növekedését mutatták ki, ha a PCR során a kötődési hőmérsékletet csökkentették. Ez az eredmény megerősíti az általunk tapasztaltakat. Vagyis a preferenciális amplifikáció és a primer hibák okozta torzulások a PCR során megelőzhetők, vagy legalábbis erőteljesen csökkenthetők a primer kötődési hőmérséklet csökkentésével.

Törzs	Operon szám	Genom méret (10 ⁶ bp)	Operon gyakoriság (/ 10 ⁶ bp)	Operon gyakoriság aránya			
				AH	BC	BS	PF
AH	10	4.50	2.22	1.00	0.92 - 1.00	0.94 - 1.17	2.95
BC	12 - 13	5.40 - 5.41	2.22 - 2.40	1.00 - 1.08	1.00	0.93 - 1.27	2.94 - 3.19
BS	8 - 10	4.21	1.90 - 2.38	0.86 - 1.07	1.79 - 1.07	1.00	2.52 - 3.15
PF	5	6.63	0.75	0.34	0.31 - 0.34	0.32 - 0.40	1.00

20. táblázat. A genom méret és a rRNS operonszám vizsgált törzseink esetében. Az operon gyakoriság értékeit a Ribosomal RNA Operon Copy Number Database (<http://rrnadb.cme.msu.edu/rrnadb>) adatai alapján számítottuk.

Következőnek a ciklusszám torzító hatását elemeztük multitemplát PCR alkalmazások során. Az 56. ábrán azt mutatjuk be, hogy a genomi DNS tulajdonságok befolyásolták a PCR mennyiségi eredményét. Amikor az *A. hydrophila* és a *B. subtilis*, ill. az *A. hydrophila* és a *P. fluorescens* (vagyis illeszkedési hibás és pontos) 27F és 1492R primerpárokkal készült PCR termékeit kevertük össze és újabb PCR-nek vetettük alá most már a 63F primerrel, akkor a ciklusszám gyakorlatilag nem befolyásolta a kiindulási templát arányhoz viszonyítva a termékarányt, annak ellenére, hogy az illeszkedési hiba hatása nyilvánvaló. Az illeszkedési hibás (*A. hydrophila* / *B. subtilis*) esetben azonban a ciklusszám növelése csekély mértékben csökkentette a torzulás mértékét.



56. ábra. A PCR ciklusszám hatása a T-RF-ek csúcs alatti területére *Aeromonas hydrophila* (AH) és *Bacillus subtilis* (BS), ill. *Aeromonas hydrophila* (AH) és *Pseudomonas fluorescens* (PF) törzspárokból nyert PCR termék esetében, valamint az *Aeromonas hydrophila* (AH) és a *Pseudomonas fluorescens* (PF) törzspárnál a genomi DNS hatása. Az első két alkalommal a 27F - 1492R primerrel előállított tisztított PCR termékeket, míg a másodikban a genomi DNS-eket kevertük 1 : 1 arányban, majd PCR-t végeztünk 54 °C primerkötési hőmérsékleten a 63F - 1492R primerpárral. A terméket a *Hin*6I enzimmal emésztettük. A hibavonalak értékét három különböző keverésből végzett három-három PCR, valamint minden termékénél három-három párhuzamos T-RFLP eredményéből számítottuk. A PCR-t 18, 24, 32, ill. 48 ciklus után végső extenzióval zártuk.

Az elvégzett egyszerű modellkísérletek eredményei arra engednek következtetni, hogy a preferenciális amplifikáció hatásának csökkentése érdekében csökkenteni kell a PCR során a primerkötődéshez alkalmazott hőmérsékletet. Ezt a feltételezést ellenőriztük egy környezeti minta diverzitásának elemzésével is. Gyékény rizoplánból kivont DNS-ből 26F / 1387R és 63F / 1387R primerpárokkal végeztünk PCR-t különböző primerkötési hőmérséklet alkalmazásával és a terméket T-RFLP segítségével elemeztük (21. táblázat). A legtöbb T-RF mindkét primer pár használatával megegyezett, bár mindkét esetben találtunk egyedi csúcsokat, amelyek a másik esetben nem fordultak elő. Ez a tény a primerek által okozott hiba meglétére utal (57. ábra).

A primerkötési hőfok emelésével csökkent a T-RFLP csúcsok száma mindkét esetben (21. táblázat), ami közösségi szinten értékelve a közösség fajkészletének szegényedését jelentené. Ez az eredmény ellentétes Osborn és mtsai (2000) megállapításával, akik szerint a primerkötődési hőfok emelésével nő a T-RF-ek száma. A különbség feltehetően a T-RF-ek elválasztására alkalmazott eljárás különbségére vezethető vissza. Esetünkben a kapilláris elektroforézisnél a mintafelvitel automatikus (a teljes csúcs alatti terület maximális értékére optimalt), míg ők akrilamid gélen választották el a mintát jóval nagyobb mintatérfogatok alkalmazásával.

Nem csupán új csúcsok megjelenésére számíthattunk a kisebb primerkötődési hőfokoknál, hanem a csúcsok egymáshoz viszonyított mérete is megváltozott, vagyis egyféle (relatív) abundancia változás történt (57.a. ábra). Figyeljük meg az ábrán az A, B és C betűkkel jelzett csúcsok esetét. A 27F primer használatakor a hőmérséklet emelése nem okozott lényeges csúcs alatti területarány változást. A 64F primer esetén viszont a C csúcs szinte eltűnik a hőfok növelésével (a számszerű adatokat a 21. táblázat tartalmazza). Ez a változás feltehetőleg a primer illeszkedési hibáját tükrözi a gyékény rizoplán minta C filospéciesze esetében. A Shannon féle diverzitásindex egyébként primerpártól függetlenül csökkent a primerkötési hőfok emelésével (kivéve az 59,9 °C-on mért értéket a 63F primernél). Egyébként a Shannon index növekedését jórészt a C csúcs esetében tapasztaltak magyarázzák. Vagyis a modellkísérletben tapasztaltakat meg tudtuk ismételni a környezeti minta elemzése során is. Ezért azután elemeztük a PCR ciklusszám hatását is a rizoplán minta diverzitás vizsgálatában.

A 27F / 1387R primerpár használatánál a ciklusszám növelése csekély mértékben növelte a T-RF csúcsok számát, ugyanakkor a 63F/1387R primerpár esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást (21. táblázat és 57.b. ábra). A Shannon féle diverzitás indexek értéke azonban egyik primerpár használatánál sem változott a ciklusszám függvényében. Ez megint csak ellentétes Osborn és mtsai (2000) eredményével, akik a ciklusszám növelésével komple-

xebb T-RFLP képet nyertek. E tényből arra következtethetünk, hogy az ujjenyomat módszerek értékelése esetén a T-RF számmal szemben a diverzitási indexek alkalmazása jobb indikátor (Saikaly és mtsai, 2005; Loisel és mtsai, 2006).

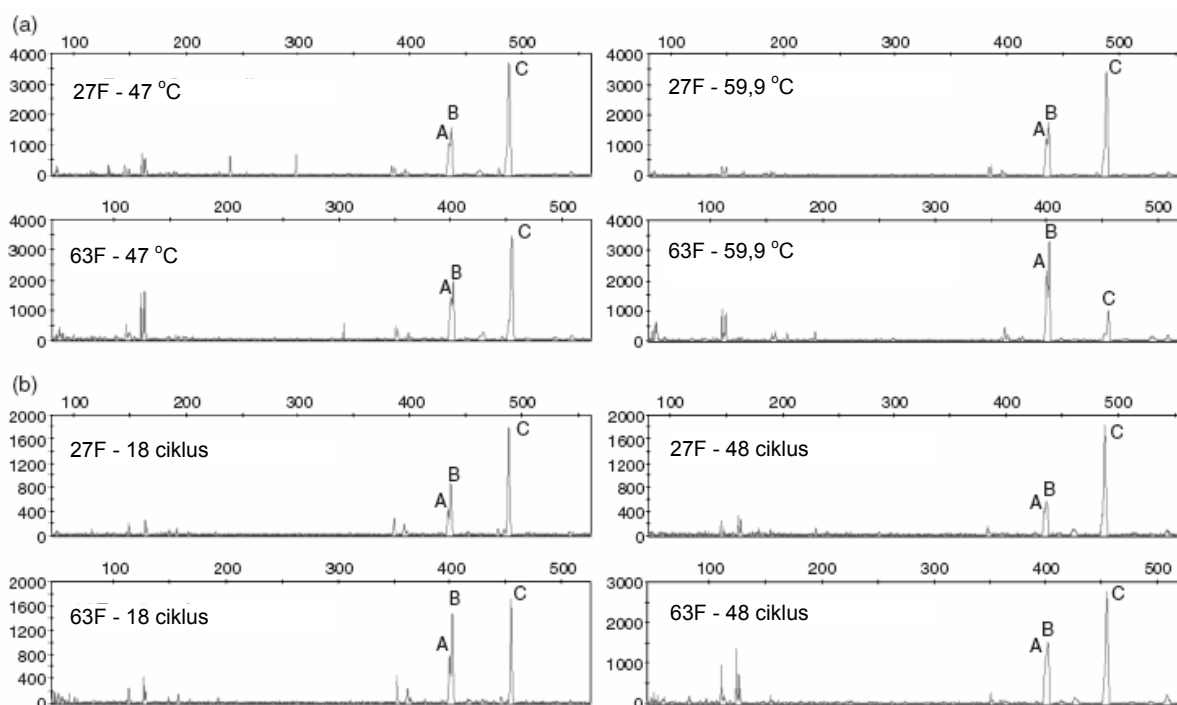
Ezek az eredmények egyébként arra utalnak, hogy Suzuki és Giovannoni (1996) túlértékelte a ciklusszám torzító hatását. Úgy tűnik, hogy még nagy ciklusszámok alkalmazása sem okoz jelentős torzulást (Lueders és Friedrich, 2003; Acinas és mtsai, 2005), bár tudjuk, hogy ilyenkor különböző álmérkek is képződhetnek, pl. kimérák (Wang és Wang, 1997), heteroduplexek, vagy akár egyszálú DNS molekulák (Jensen és Straus, 1993; Quin és mtsai, 2001).

Primer	Primerkötési hőmérséklet (°C)	Ciklusszám	T-RF csúcsszám	Shannon index (H)	(A+B)/C*
27F	47.0	32	71.5 ± 14.8	1.19 ± 0.06	0.57 ± 0.02
27F	50.9	32	65.0 ± 7.1	1.06 ± 0.04	0.56 ± 0.02
27F	55.3	32	58.0 ± 1.4	0.99 ± 0.01	0.60 ± 0.03
27F	59.9	32	49.0 ± 5.7	0.94 ± 0.01	0.67 ± 0.04
63F	47.0	32	83.0 ± 1.4	1.31 ± 0.01	0.71 ± 0.01
63F	50.9	32	75.5 ± 13.4	1.21 ± 0.08	0.78 ± 0.04
63F	55.3	32	72.5 ± 8.7	1.17 ± 0.03	1.38 ± 0.13
63F	59.9	32	70.7 ± 4.0	1.34 ± 0.05	3.89 ± 0.19
27F	52.0	18	19.0 ± 2.6	0.89 ± 0.02	0.73 ± 0.02
27F	52.0	24	22.0 ± 1.4	0.93 ± 0.00	0.82 ± 0.02
27F	52.0	32	24.7 ± 5.5	0.87 ± 0.05	0.67 ± 0.01
27F	52.0	48	30.7 ± 7.8	0.91 ± 0.07	0.55 ± 0.04
63F	52.0	18	30.0 ± 1.7	1.04 ± 0.02	1.26 ± 0.02
63F	52.0	24	26.8 ± 4.3	1.02 ± 0.02	1.40 ± 0.06
63F	52.0	32	33.0 ± 2.1	1.07 ± 0.03	1.03 ± 0.05
63F	52.0	48	26.5 ± 0.7	1.03 ± 0.03	0.83 ± 0.03

21. táblázat. A PCR paraméterek hatásának értékelése a gyékény rizoplán mintáink T-RFLP elemzési eredményeire. *A csúcs alatti területek aránya (az 57. ábra kromatogramjai alapján).

Mivel a tökéletesen illeszkedő „univerzális” primerek tervezése megoldhatatlan feladat (Forney és mtsai, 2004), munkánk során mindig figyelembe kell venni a primerhibák okozta torzulások lehetőségét. Vagyis ellenőriznünk kell a PCR paraméterek optimális beállítását. Az újonnan tervezett domén specifikus primerek tesztelésénél mind törzsekkel, mind pedig környezeti DNS felhasználásával vizsgálni szokták a hatékonyságot (pl. Marchesi és mtsai, 1998; Baker és mtsai, 2003). E tesztek sorába be kell vonni a preferenciális amplifikáció szintjének ellenőrzését is. Azzal ellentétben, amit a szakirodalomban ajánlanak

(a pontosság érdekében növelni kell a kötődési hőfokot [Hansen és mtsai, 1998]; alkalmazunk ún. „touchdown” PCR eljárást [Simpson és mtsai, 2000]), eredményeink alapján éppen fordítva kell gondolkodni, hogy a preferenciális amplifikációt csökkentjük. A PCR amplifikáció optimalizálásánál a legfontosabb a lehető legkisebb primer kötődési hőfok kikísérletezése (ahol azonban még hibás primerkötődés nem jellemző), majd pedig kis (25 körüli) ciklusszám alkalmazásával állítsuk elő a terméket. Csekély termékmennyiség esetében párhuzamos PCR-ek termékének „összekoncentrációja” ajánlott, hogy elegendő DNS-t nyerjünk a további elemzésekhez.



57. ábra. A különböző PCR paraméterek hatása a gyékény rizoplán minta 27F, ill. 63F / 1492R primerpárokkal készült és az *MspI* restrikciós enzimmal készült T-RFLP mintáira. A kromatogramokat az x tengely mentén a jobb összehasonlíthatóság kedvéért illesztettük (36 bázisnyi eltolódás van a különböző forward primerek miatt). Az A, B, ill. C betűkkel jelzett csúcsok (vagyis genospécieszek) viszonyát a szövegben tárgyaljuk.

a. A primer kötési hőmérséklet hatása a T-RFLP profilra, b. A PCR ciklusszám hatása a T-RFLP profil alakulására.

5.4.2. A denaturáló gradiens gélelektroforézis molekuláris ujjlenyomat módszer hiányosságainak elemzése

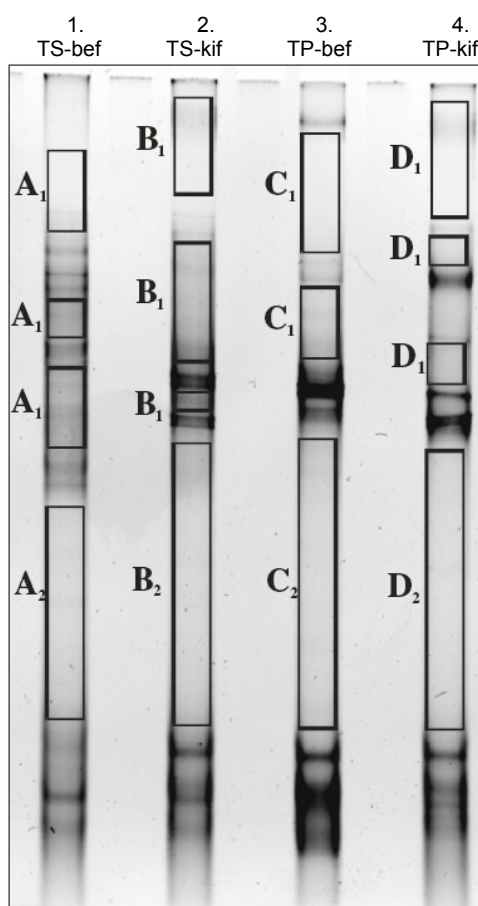
A környezeti mikrobiológiai molekuláris elemzések népszerűsége töretlenül nő a tenyésztési módszerekkel szemben (Amann és mtsai, 1995; Bull és mtsai, 2000), a legnépszerűbb eljárás sokáig a 16 / 18S rDNS PCR termékekre alapozott klónkönyvtárak filogenetikai feltárása volt (Borneman és mtsai, 1996; Kuske és mtsai, 1997; Nikolausz és mtsai, 2004). Ez

a klónozásra alapozott diverzitás elemzés azonban nemcsak költséges, hanem meglehetősen munka- és időigényes is, főképpen, ha sok mintát akarunk összehasonlítani. A molekuláris ujjlenyomat eljárások alkalmazása ezen nehézségek leküzdését segíti. Itt csak mintázatokot nyerünk, de összehasonlításuk a mintában bekövetkezett változásokat jól tükrözi. A DGGE esetében az egyes csíkok kivághatók és bázissorrendjük meghatározható (Muyzer és Smalla, 1998). A DGGE technika kimutatási határa azonban kicsi, vagyis a közösségek domináns állományalkotó fajait fogjuk csak jó eséllyel detektálni. Még a legkomplexebb közösségek esetében is a megkülönböztethető csíkok száma alig pár tucat. Ez a szám éles ellentétben van a DNS hibridizációs kinetikai vizsgálatok alapján becsült többeszes genospéciesz számokkal (pl. egy erdőtalaj esetében, Torsvik és mtsai, 1990a; és b). Ráadásul, mivel a vizsgálatot megelőző PCR torzíthatja a genospécieszek relatív abundancia arányát (von Wintzingenrode és mtsai, 1997; Suzuki és Giovannoni, 1996; Sipos és mtsai, 2007) az is elképzelhető, hogy akár nem is detektált szervezetek kulcsszerepet töltenek be a mintaterületen zajló biogeokémiai folyamatokban (Bothe és mtsai, 2000; Gomes és mtsai, 2001). A taxon specifikus szelektív megközelítés módszerén kívül nem ismerünk sajnos ma még olyan eljárást, amelyik a közösség számarányát tekintve minor tagjait is kimutatja (Kowalchuk és mtsai, 2000; Boon és mtsai, 2002). A kutatók legnagyobb része eleddig azt feltételezte, hogy a DGGE és TGGE esetében a gélben a csíkok között felfedezhető háttérzajt (smear) pont a kis koncentrációjú amplikonok okozzák (Felske és mtsai, 1997). Erre a feltételezésre építve úgy gondoltuk, hogy a "háttérből" kivont DNS újra PCR-ezése és elemzése segítségével a minor genotípusokat is kimutathatjuk. Az eredmény azonban nem ez lett, egyfajta PCR - DGGE hibát tártunk fel.

A háttér régiókat a gélből kivágtuk és kivontuk DNS tartalmát, majd újra PCR-eztük és a terméket DGGE segítségével elemeztük. A gél kis denaturálószer koncentrációjú részein általában erős volt a háttérzaj (58. ábra, az ábrákon felül található szakaszok; A₁, B₁, C₁, D₁), sőt még akár halvány csíkokat is láhattunk (pl. A₁). A nagy denaturálószer koncentrációjú szakaszok esetében a háttérzaj hihetetlenül kicsi (A₂, B₂, C₂, D₂) volt. Amikor a kivágott gélekből izolált DNS-re alapozott PCR terméket együtt futattuk az eredeti termékkel teljesen azonos gél- és futási körülményeket biztosítva, legnagyobb meglepetésünkre az eredeti mintához nagy mértékben hasonló mintázatot nyertünk ahelyett, hogy új csíkokat kaptunk volna (59. ábra). Az 1-es (befolyó, rizoszféra), a 2-es (kifolyó rizoszféra) és a 4-es (kifolyó rizoplán) mintánál a visszaizolált DNS gyakorlatilag valamennyi, az eredetinek megfelelő csíkot tartalmazta (60. ábra). Sem a kivágott gél "helye" (kis vagy nagy denaturálószer koncentráció), sem pedig DNS tartalma (erős háttér, gyenge háttér), vagy festés intenzitása nem befolyásolta lényegesen a DGGE mintázatot. Csupán a 3. minta (befolyó rizoplán) esetében

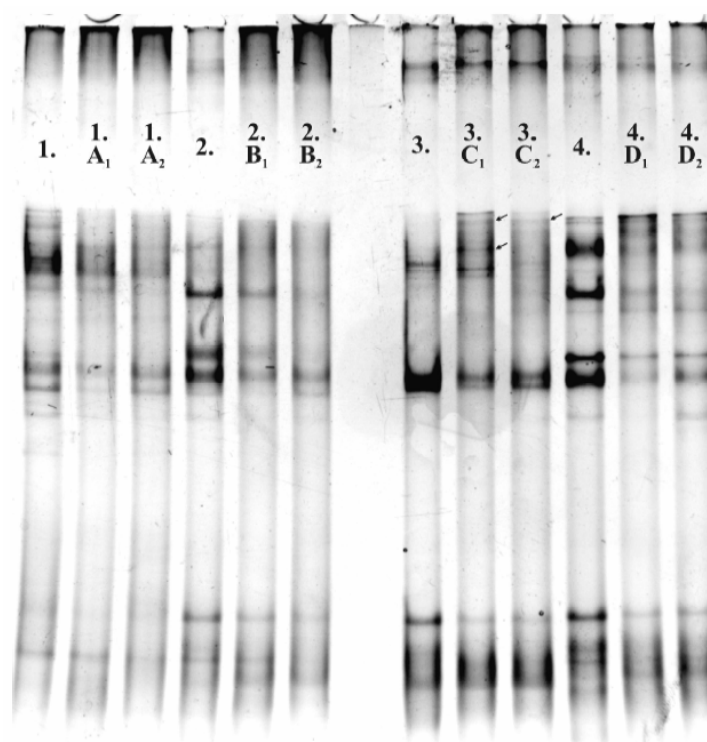
kaptunk új sávokat és itt a gélben összességében több sáv volt az eredeti mintázathoz viszonyítva.

Kísérletünket új rizoplán minták alkalmazásával megismételtük és ezúttal még gondosabban figyeltünk a keresztszennyezések elkerülésére a gélkivágásnál. Továbbá az első minták vizsgálata során alkalmazott „fészkes” (nested) PCR eljárást is, mint lehetséges hibaforrást figyelembe vettük, ezért vizsgálatainkat mind direkt (63F / 338R), mind pedig nested PCR segítségével elemeztük. A két eltérő PCR termékből kapott DGGE mintázatok gyakorlatilag azonosak voltak, csupán a relatív sávintenzitásban voltak eltérések megfigyelhetők (61.a. és b. ábra). E kísérlet során a DGGE futtatást megelőzően a PCR terméket tisztítottuk, hogy megszabaduljunk a be nem épült primerek maradékától. A kivágott gélekből reamplifikált termék mintázata ez esetben is szinte teljesen megegyezett az eredetivel, függetlenül a kivágás helyétől (61.b. ábra). Úgy tűnik, hogy sem a nested PCR alkalmazása, sem pedig a PCR termék tisztítása nem befolyásolja a DGGE mintázati képet.



58. ábra. A demjéni mesterséges nedves terület szennyvíztisztító gyékényes medencéjéből vett rizoszféra (TS) és rizoplán (TP) minták 16S rDNS alapú DGGE elemzésének eredménye. A „háttérzaj” elemzésre kivágott gélszakaszokat keretezéssel jelöltük (1 = A = rizoszféra befolyó, 2 = B = rizoszféra elfolyó, 3 = C = rizoszféra befolyó, 4 = D = rizoplán elfolyó).

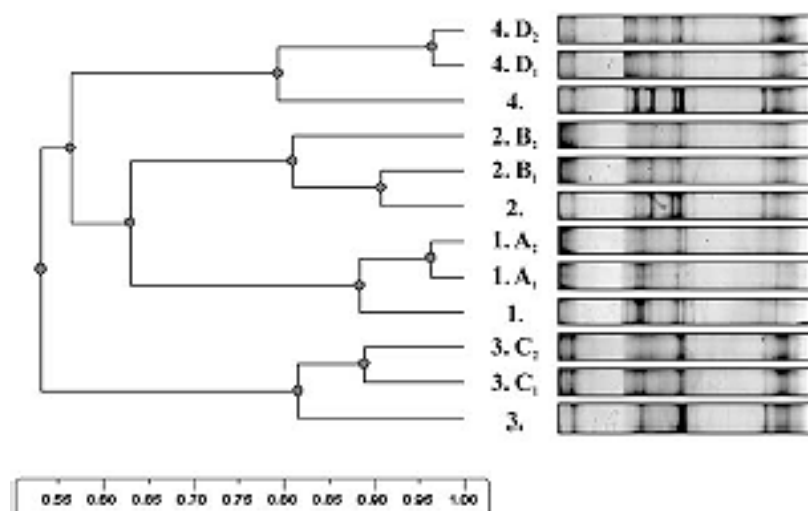
DNS szakaszok tisztítására irányuló kísérletek során már beszámoltak különböző DNS-ek „együtt-vándorlásának” jelenségéről (Ferris és mtsai, 1996; Sekiguchi és mtsai, 2001). Úgy tűnik, hogy ez a probléma általánosabb lehet, mint az a szakirodalomból kitűnik. Hasonló eredményt tapasztaltak egyébként az SSCP során is (Schmalenberger és Tebbe, 2003). Közel rokon fajok szekvenciáinak DGGE elválasztásainál is felfigyeltek már az „életlen” (kiterjedt, zavaros) sávok jelenségére, amit a DNS-ben található „olvadási domének” hatásának tulajdonítottak (Kisand és Wikner, 2003). Ez egyébként a PCR-t is befolyásolhatja. A PCR során a nem teljes DNS szál szintézis ugyancsak előidézheti egyetlen templát esetében is több DGGE sáv kialakulását, ami azután a re-amplifikáció során fokozza a gondokat (Nübel és mtsai, 1996; Janse és mtsai, 2004).



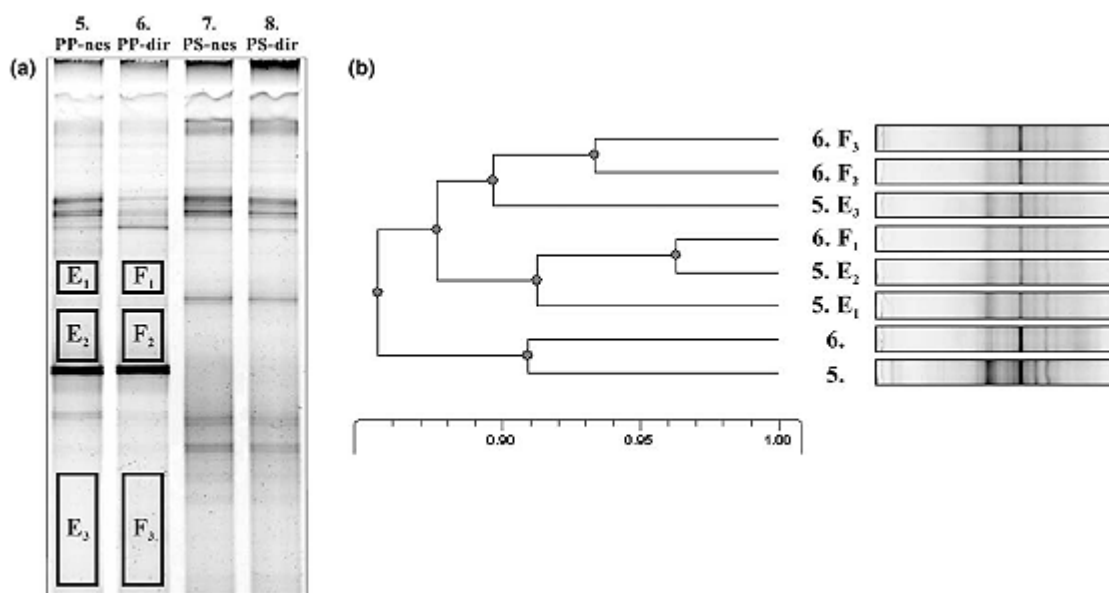
59. ábra. Az eredeti DNS-ek (1-4) és a kivágott gélszakaszokból készített PCR termékek összehasonlító DGGE elemzésének eredménye. Az új csíkokat nyilak jelölik (1 = A = rizoszféra befolyó, 2 = B = rizoszféra elfolyó, 3 = C = rizoszféra befolyó, 4 = D = rizoplán elfolyó).

Vizsgálataink azonban nemcsak azt erősítik meg, hogy a nagyon hasonló olvadási tulajdonságú DNS-ek „vándorolnak együtt” a gélben, hanem a domináns amplikonok mindenütt megtalálhatók a gélben. Mintha a háttérzajban „minden mindenütt” jelen lenne, és azután a PCR „választ” ezekből a reamplifikáció során. Ez az eredmény arra utal, hogy a DGGE gélben a mintázat nem pusztán az amplikonok elválása révén jön létre, az olvadási tulajdonságok szerint, hanem a DNS darabok közötti komplex szerkezeti kölcsönhatások hozzák létre. Egyfonalas DNS képződését PCR során már korábban kimutatták (Jensen és Straus, 1993; Egert

és Friedrich, 2003), ez is befolyásolhatja a reamplifikációt. A heteroduplexek képződését is tapasztalták. Satokari és mtsai (2001) *Bifidobacterium* törzsek DGGE vizsgálatánál észlelték a sávszám növekedést ilyen okra visszavezethetően. Speksnijder és mtsai (2001) közel rokon 16S rDNS mintákat elegyítettek meghatározott arányban és két új DGGE sávot is kaptak.



60. ábra. Az eredeti és a kivágott gélszakaszokból készített PCR termékek DGGE sávjainak csoportelemzése (UPGMA eljárás)(1 = A = rizoszféra befolyó, 2 = B = rizoszféra elfolyó, 3 = C = rizoszféra befolyó, 4 = D = rizoplán elfolyó).



61. ábra. A demjéni mesterséges nedves területen szennyvíztisztító nádas medencéjéből vett rizoszféra (PS) és rizoplán (PP) minták 16S rDNS alapú DGGE elemzésének eredménye. A PCR reakciót közvetlenül (dir) a mintából, illetve nested (nes) eljárással is elvégeztük. a. A közvetlen és a nested PCR DGGE összehasonlítása. A DNS re-amplifikációra kivágott gélrészleteket keretbe véve jelöltük. b. Az eredeti és reamplifikált rizoplán minták összehasonlító csoportelemzésének eredménye. Az egy gélben történt párhuzamos futások mintázatából az UPGMA algoritmussal készítettük a dendrogramot.

Ráadásul az egyes sávok reamplifikálását követő DGGE futtatás csupán ismételte a torzult sávmintázatot. Ők is a heteroduplex képződéssel magyarázták a kapott hibát. Ha ezeket az eredményeket összevetjük saját eredményeinkkel, amelyeket környezeti DNS minta elemzése során nyertünk, azt kell feltételeznünk, hogy nemcsak heteroduplex képződés, hanem akár komplexebb kölcsönhatások is befolyásolják a sávmintázat alakulását. Az amplikonok egyfajta véletlenszerű eloszlása a háttérzajban eddig még ismeretlen volt, ugyanakkor a feltárt jelenség megkérdőjelezi azt is, hogy az egyes sávok kivágása és bázissorrend elemzése során vajon mire vonatkozó információt is nyerünk.

A DGGE eljárást eredetileg pontmutációk elválasztására dolgozták ki (Myers és mtsai, 1985). A mikrobiális ökológiában ezzel szemben hihetetlenül összetett PCR termék elválasztását várjuk el a legtöbb esetben.

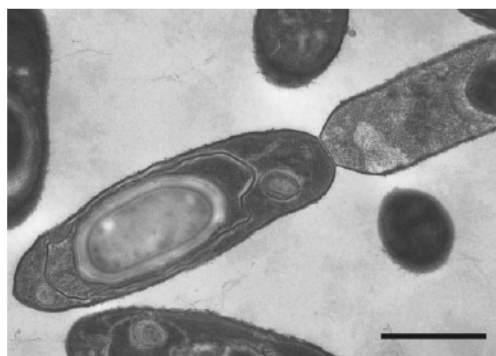
V.5. Polifázikus fajleírás: *Bacillus aurantiacus* sp. nov.

A fajleírás a bakteriológiában szigorú szabályok alapján történik, még a kézirat szerkezete, tartalma is kötött. E munka bemutatása során ragaszkodni fogok ehhez a kötött formához, azzal a kivétellel, hogy a módszertani részek természetesen a IV. fejezet megfelelő pontjaiban találhatók meg.

A természetes lúgos (alkalikus) környezetekben - különösen a világban sok helyütt előforduló szikes tavakban - filogenetikai tekintetben változatos, a különleges élőhelyekhez adaptált mikroorganizmusok nagy populációi jellemzők (Jones és mtsai, 1998; Martins és mtsai, 2001; Rees és mtsai, 2004). A közelmúltban jó néhány alkalifil és / vagy halofil *Bacillus* fajt írtak le ilyen különleges környezetekből (Agnew és mtsai, 1995; Nielsen és mtsai, 1995; Lim és mtsai, 2006.a. és b.). E vizsgálatokat nemcsak a fajok rendszertani újdonsága és ökológiai fontossága indokolta, hanem a kérdéses mikroorganizmusok biotechnológiai és ipari célú alkalmazhatósága is (Horikoshi, 1996; Nogi és mtsai, 2005). Az Eurázsia mérsékelt éghajlati övében gyakori szikes tavak különböző típusainak legnyugatibb előfordulását Magyarországon lelhetjük. E sekély tavak jellemzően két nagy víztestre tagolódnak, a 0,5 - 1,5 m mély nyíltvízre és a nádasokkal borított parti övezetre. Az elmúlt néhány évben tenyésztési diverzitás elemzési eljárások segítségével igyekeztünk nagy mélységekben felderíteni e különleges élőhelyekhez adaptált baktériumközösségek tagjait. A tenyészthető baktériumok között valamennyi esetben dominánsak voltak a különböző alkalitoleráns, vagy alkalifil *Bacillus* fajok, mind a víztest, mind a fenéküledék, mind pedig a nád (*Phragmites australis*) vízben álló szárainak perifiton közösségeiben (Borsodi és mtsai, 2005; 2007). A

jelen munka célja egy új alkalifil és mérsékelten halofil *Bacillus* faj leírása, amelyet két nagyon sekély szikes tóból is izoláltunk.

A K1-5^T, K1-10 és B1-1 törzsek módosított tengervíz agaron kerek, ép szegélyű, sima felületű, feldomborodó aranyos-narancssárga színű telepeket képeznek. A pálcika alakú (0.8 - 1.0 x 3,2 - 4,5 µm) Gram-pozitívan festődő sejtek a kenetekben jellemzően magánosan, vagy párokból fordulnak elő. Rövid lánc képzés csak nagyritkán észlelhető. A sejtek aktív mozgást mutatnak függőcepp tenyészetben. Az ellipszoid endospórák centrális, vagy szubterminális elhelyezkedésűek és nem deformálják a sporangiumot (62. ábra). Mindhárom törzs jól nőtt húspepton levesben, vagy < 15 % (K1-5^T), < 13 % (K1-10), ill. < 12 % (B1-1) NaCl-dal kiegészített húspepton levesben. A K1-5^T típustörzs, valamint a rokon *Bacillus* fajok típustörzseinek megkülönböztető fenotípusos bélyegeit a 22. táblázatban mutatjuk be.



62. ábra. A *Bacillus aurantiacus* sp. nov K1-5^T sejteinek hosszirányú metszetén jól látszik a centrális, vagy szubterminális elhelyezkedésű ellipszoid endospóra. A méretjel hossza 1 µm.

A Biolog GP2 mikrolemezeken mindhárom törzs oxidálta a Tween 40, α-d-glükóz, 3-metil-glükóz, ecetsav, γ-hidroxi-vajsav, piroszőlősav és glicerinné szénforrásokat. A szénforrások egy részét az egyes törzsek eltérően hasznosították (23. táblázat). Az α-ciklodextrin, β-ciklodextrin, dextrin, glikogén, inulin, mannán, L-arabinóz, D-arabitol, arbutin, cellobióz, D-fruktóz, L-fukóz, D-galaktóz, D-galakturonsav, gentiobióz, α-D-laktóz, laktulóz, maltóz, maltotrióz, D-mannitol, D-mannóz, melecitóz, metil-α-D-galaktozid, metil-β-D-galaktozid, metil-α-D-glükózid, metil-β-D-glükózid, metil-α-D-mannozid, palatinóz, D-pszikóz, raffinóz, L-ramnóz, D-ribóz, szalicin, szedoheptulózán, D-szorbitol, D-tagatóz, turanóz, xilitol, D-xilóz, α-hidroxi-vajsav, β-hidroxi-vajsav, laktamid, D-tejsav-metil-észter, L-tejsav, D- és L-almasav, metil-piruvát, monometil-szukcinát, alaninamid, D- és L-alanin, L-alanil-glicin, L-aszparagin, L-glutamin, glicil-L-glutaminsav, L-pirolglutaminsav, L-szerin, adenozin, inozin, timidin, uridin, adenozin-5'-monofoszfát, timidin-5'-monofoszfát, uridin-5'-monofoszfát, fruktóz-6-foszfát és glükóz-1-foszfát szénforrásokat nem hasznosították.

Tulajdonság	K1-5 ^T	1	2	3	4	5	6	7
Telepszín	Narancs	Fehér	Krém	Sárga	Krém	Sárga	Krém	Sárgásfehér
Sejtalak	Pálca	Pálca	Pálca	Pálca	Pálca	Kokkusz	Pálca	Pálca
Sejtméret (µm)	0.8 - 1.0 x 3.2 - 4.5	0.5 - 0.6 x 2.0 - 5.0	0.3 - 0.4 x 2.0 - 3.0	0.6 - 0.7 x 2.0 - 5.0	0.3 - 0.5 x 1.3 - 1.9	0.8 - 0.9	0.5 - 1.2 x 1.2 - 1.9	ND
Spóra alak	E	E	E	E	S	-	E	S
Spóra elhelyezkedés	ST/C	ST	ST	T	T	-	T	T
Deformált sporangium	-	+	+	+	+	-	+	ND
Mozgásképeség	-	+	+	ND	-	-	+	+
Csillózat	-	ND	Peritrih	ND	-	-	Poláris	Peritrih
Oxidáz	-	-	-	-	+	+	+	+
Anaerób növekedés	-	-	ND	-	-	ND	ND	+
Nitrát redukciója nitrátté	-	+	+	+	-	+	+	+
Hidrolitikus képesség:								
Eszkulin	-	+	ND	+	+	ND	+	+
Kazein	-	+	-	+	-	-	-	-
Zselatin	-	+	-	+	ND	+	-	+
Keményítő	-	+	+	-	-	-	+	-
Tween 80	+	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Tirozin bontás	-	ND	ND	ND	-	+	+	ND
Fenilalanin dezamináz	-	-	ND	-	ND	-	ND	ND
Hőmérsékleti optimum (°C)	28	30	37	30	30	37	35	ND
NaCl (% m / v) igény:								
sáv	0 - 15	0 - 16	0 - 12	0 - 15	3 - 20	> 0 - 25	0 - 12	0 - 8
optimum	3 - 7	ND	ND	ND	10 - 12	16	2 - 5	ND
pH tolerancia:								
sáv	8.0 - 12.0	> 7.0	8.0 - 10.0	> 7.0	6.8 - 9.5	7.0 - 10.0	5.5 - 9.0	9.0 - 10.0
optimum	9.5 - 10.0	10.0	9.0 - 10.0	10.0	8.0	9.0	7.5	10.0
DNS G+C tartalom (mol %)	42.9	39.3 - 39.5	39.6	42.4 - 43.0	43.0	48.4	36.0	38.3

22. táblázat. A *Bacillus aurantiacus* sp. nov. K1-5^T törzse és a közel rokon fajok megkülönböztető fenotipikai bélyegei. Típustörzsek: K1-5^T (jelen tanulmány adatai); 1. *B. agaradhearens* (Nielsen és mtsai, 1995); 2. *B. cellulosilyticus* (Nogi és mtsai, 2005); 3. *B. clarkii* (Nielsen és mtsai, 1995); 4. *B. salarius* (Lim és mtsai, 2006.b.); 5. *B. saliphilus* (Romano és mtsai, 2005); 6. *B. taeaanensis* (Lim és mtsai, 2006.a.); 7. *B. vedderi* (Agnew és mtsai, 1995; Nogi és mtsai, 2005). Rövidítések: E: ellipszoid; S: kerek; C: centrális; ST: szubterminális; T: terminális; ND: nem vizsgált bélyeg.

Szénforrás	K1-5 ^T	K1-10	B1-1
Tween 40	+	+	+
Tween 80	+/-	+	+
N-acetil-D-glükózamin	+/-	+	+
N-acetil-D-mannózamin	+/-	-	+
Amigdalín	-	+/-	+
D-glukonsav	+/-	+/-	+/-
α-D-glükóz	+	+	+
mio-inozitol	-	+/-	+
D-melibióz	+	+	+/-
3-metil-glükóz	+	+	+
Sztahióz	+/-	+/-	+
Szukróz	+	+/-	+
D-trehalóz	+	+/-	+/-
Ecetsav	+	+	+
γ-hidroxi-vajsav	+	+	+
p-hidroxi-fenilecetsav	+/-	-	+
α-keto-glutársav	+/-	+/-	+
α-keto-valeriánsav	+	+/-	+
Propionsav	+/-	+	+/-
Piroszölősav	+	+	+
Szukcinamidsav	-	-	+
Borostyánkősav	+/-	-	+
N-acetil-L-glutaminsav	+/-	-	+
Putreszcin	-	-	+
2,3-butándiol	+/-	+/-	+
Glicerín	+	+	+
2'-dezoxi-adenozin	+/-	+	-
Glükóz-6-foszfát	+/-	+/-	+
D,L-α-glicerín-foszfát	+/-	-	+

23. táblázat. A *Bacillus aurantiacus* sp. nov. törzseinek Biolog GP2 szénforrás értékesítése.

A típustörzs sejtfala mezo-diamino-pimelinsavat tartalmazott, ami az A1γ peptidoglikán típusra utaló bélyeg. A fő izoprén kinon vegyület a K1-5^T törzsben MK-7 volt és kisebb mennyiségben MK-6-ot is kimutattunk. Mindhárom törzs zsírsav profiljában az anteizo C_{15:0} komponens dominált. A további jellemző zsírsavak az i-C_{15:0} és az i-C_{17:0} voltak. A három törzs teljes zsírsavprofilja egyébként nagyon hasonló (24. táblázat), ugyanakkor jellegzetes különbségeket mutattunk ki a legközelebbi rokon fajokkal (*Bacillus cellulosilyticus*, *Bacillus clarkii*, *Bacillus vedderi*) összehasonlítva. A K1-5^T típustörzsre a difoszfátidil-diglicerín, a foszfátidil-glicerín, a foszfátidil-etanolamin és egy ismeretlen poláris lipid volt jellemző.

A K1-5^T típustörzs DNS G + C tartalma 42,9 mól %. A három törzs DNS - DNS hibridizációs hasonlósága nagymértékű volt (K1-5^T / K1-10 86,8 % [megismételve 89,6 %]; K1-5^T / B1-1 88,0 % [megismételve 91,8 %]; K1-10 / B1-1 95,3 % [megismételve 97,9 %],

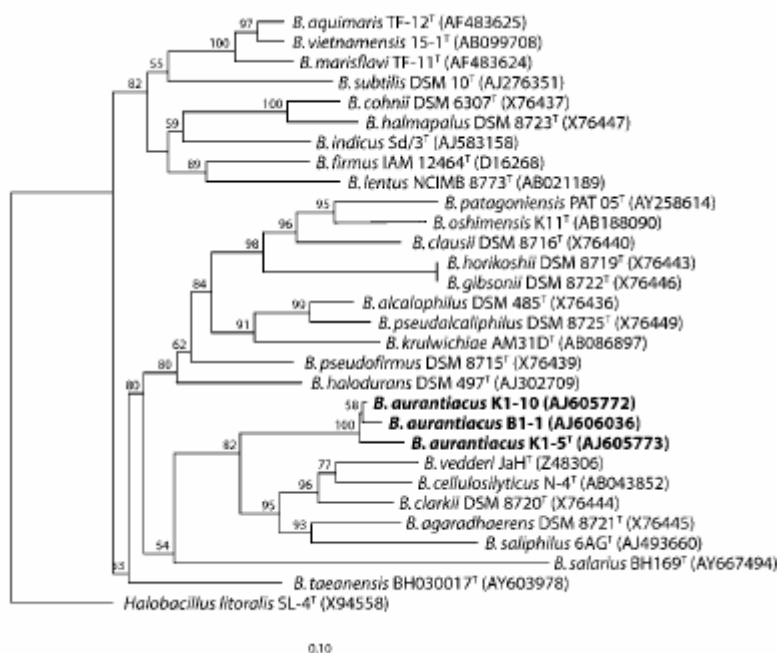
ami bizonyítja, hogy a három törzs egy fajba tartozik. A Kimura kétparaméteres hasonlóság-számításra alapozott, neighbour-joining eljárással készített törzsfában a K1-5^T, K1-10 és B1-1 törzsek egy csoportba estek a *B. clarkii* DSM8720^T, *B. cellulosilyticus* N-4^T, *B. vedderi* JaH^T, *Bacillus agaradhaerens* DSM8721^T és a *Bacillus saliphilus* 6AG^T törzsekkel. A 16S rDNS bázissorrend hasonlóságok értékei: 94,7 - 95,8, 94,5 - 95,7, 94,3 - 95,4, 93,9 - 95,2 és 92,2 - 93,3 % (63. ábra). Ugyanakkor a K1-5^T törzs majdnem teljes 16S rDNS bázissorrendje (1450 bp) 98,7, ill. 97,6 % hasonlóságot adott a K1-10 (1462 bp) ill. a B1-1 (1459 bp) törzsekkel. A K1-10 és a B1-1 törzs esetében ez az érték 98,9 %. A maximum likelihood és a least-squares algoritmussal képzett törzsfák szerkezete megegyezett a bemutatottal (63. ábra, neighbour-joining eljárás).

Zsírsav	K1-5 ^T	K1-10	B1-1	1	2	3	4	5	6	7
C _{14:0}	0.69	0.82	0.76	0.91	2.00	0.78				
C _{15:0}	ND	ND	ND			0.64			3.29	
C _{16:0}	2.43	2.77	3.22	5.28	42.00	2.25			5.41	3.00
C _{17:0}	ND	ND	ND		1.00			D		
C _{18:0}	ND	ND	ND	1.41	6.00					3.00
izo-C _{14:0}	1.53	1.71	1.61	0.91	2.00	9.67	8.95		2.46	3.00
izo-C _{15:0}	13.14	13.18	11.56	25.42	13.00	18.45	6.60	D	40.63	20.00
izo-C _{16:0}	7.40	7.00	8.26	1.66	4.00	11.35			0.96	9.00
izo-C _{17:0}	1.40	1.54	1.65	4.18	2.00	3.35	53.13		1.81	14.00
izo-C _{18:0}	ND	ND	ND							1.00
izo-C _{19:0}	ND	ND	ND							1.00
ai-C _{15:0}	55.49	53.41	52.63	40.18	23.00	35.64	18.67	89.0	25.89	15.00
ai-C _{17:0}	12.06	11.07	14.34	7.39	5.00	8.40				6.00
C _{16:1} ω7c	2.32	3.02	2.62							
C _{16:1} ω11c	ND	ND	ND	1.93					2.12	
C _{18:1} ω9c	ND	ND	ND	3.47						
izo-C _{16:1}	1.11	1.42	1.03							1.00
izo-C _{17:1}	ND	ND	ND							7.00
izo-C _{17:1} ω5c	0.70	0.83	0.59			1.09				
izo-C _{17:1} ω10c	ND	ND	ND	2.67						
ai-C _{17:1}	1.74	2.05	1.73							3.00
Összegzett jellegek*										
2	ND	ND	ND			1.55				
3	ND	ND	ND			2.18			6.70	
4	ND	ND	ND	1.53					1.76	
5	ND	ND	ND	2.30						

*Összegzett jellegek: két, vagy három zsírsav együtt, amelyeket a MIDI rendszerben nem lehetett elválasztani (2: izo-C 16:1 és/vagy C 14:0 3-OH; 3: C 16:1 ω7c és/vagy izo-C 15:0 2-OH; 4: izo-C 17:1 és/vagy anteizo-C 17:1; 5: C 18:2ω6c és/vagy anteizo-C 18:0)

24. táblázat. A *Bacillus aurantiacus* törzsei és a rokon fajok zsírsavprofilja. Törzsek: K1-5^T, K1-10, B1-1 (jelen tanulmány adatai); 1. *B. agaradhaerens* (Lim és mtsai, 2006.a.); 2. *B. cellulosilyticus* (Nogi és mtsai, 2005); 3. *B. clarkii* (Lim és mtsai, 2006a); 4. *B. salarius* (Lim és mtsai, 2006b); 5. *B. saliphilus* (Romano és mtsai, 2005); 6. *B. taeianensis* (Lim és mtsai, 2006.a.); 7. *B. vedderi* (Nogi és mtsai, 2005). (A 0,5 %-nál kisebb arányban kimutatott zsírsavak mennyiségét nem közöljük. D: kimutatott, ND: nem mutattuk ki.)

A filogenetikai eredmények és a fenotípusos különbségek együttese világosan jelzi, hogy a K1-5^T, K-1-10 és B1-1 törzsek a *Bacillus* nemzetségen belül egy új faj képviselői, amelyet a *Bacillus aurantiacus* sp. nov. fajnévvel javasolunk leírásra.



63. ábra. A *Bacillus aurantiacus* sp. nov. K1-5^T, K-1-10 és B1-1 törzseinek, valamint a közel rokon *Bacillus* nemzetségbe tartozó fajok képviselőinek 16S rRNS génre alapozott törzsfája. A fa a neighbour-joining algoritmus felhasználásával készült. A GenBank adatbázisba letett szekvenciák számjelét zárójelben tüntettük fel. Csak az 50 % feletti bootstrap értékeket (1000 ismétléses eljárás) jelezzük. A méretvonal 10 szubsztitúciót jelöl 100 nukleotidra vonatkoztatva.

A Bacillus aurantiacus sp. nov. faj leírása.

Bacillus aurantiacus (au.ran.ti.á.cus. N.L. masc. adj. *aurantiacus*, vagyis aranyos narancsszínű).

Sejtjei Gram-pozitív szabályos pálcák. Nem deformáló ellipszoid centrális, vagy szubterminális elhelyezkedésű endospórákat képez. Sejtjei mozdulatlanok. Telepei aranyos narancsszínű, kerek, ép szegélyű, sima felületű, feldomborodó alakúak. Obligát aerób. Kataláz pozitív, oxidáz negatív. D-glükózból nem termel savat és a nitrátot nem redukálja nitritté. Voges-Proskauer és metilvörös tesztekben negatív. Az ureát, eszculint, kazeint és keményítőt nem hidrolizálja. Tirozin bontási és fenilalanin dezamináz reakciója negatív, citrátot (Simmons') nem hasznosít; H₂S-t és indolt, valamint foszfatáz enzimet nem termel. A Tween 80-at hidrolizálja. 7,0 - 7,5 pH között nem mutat növekedést, csupán 8,0 és 12,0 pH közötti értékeken szaporodik. pH optimuma 9,5 - 10,0 értéken van, 3 - 7 % (m/v) NaCl tartalom mellett. 10 és 45 °C közötti hőmérsékleten növekedik, optimuma 28 °C. Fő zsírsav kompo-

nensei az ai-C_{15:0}, i-C_{15:0} és az ai-C_{17:0}. Sejtfal peptidoglikánja mezo-diamino pimelinsavat tartalmaz. A DNS G + C tartalma 42,9 mól %.

A típustörzset (K1-5^T = DSM 18675^T = CCM 7447^T = NCAIM B 002265^T) a Kelemen-szék üledékéből izolálták. A Kelemen-szék egy magyarországi különlegesen sekély szikes tó.

VI. AZ ELÉRT EREDMÉNYEK ÖSSZEGZŐ MEGBESZÉLÉSE

Miközben a környezet-mikrobiológiai kutató laboratóriumokban a legszofisztikásabb nemtenyésztéses molekuláris biológiai eljárások alkalmazásával kíséreljük meg feltárni a mikroba közösségek diverzitását, a környezetvédelmi, környezethigiéniai, közegészségügyi stb. hatósági és szolgáltató laboratóriumokban alkalmazott szabványos mikrobiológiai eljárások legnagyobb része tenyésztésen (csíraszám becslésen) alapul. Megjegyezzük, hogy a klinikai mikrobiológiai laboratóriumok döntő részében is hihetetlen sebességgel nyernek teret a nemtenyésztéses eljárások a napi "rutinban" is. A kutató laboratóriumokban alkalmazott módszertan és a hatósági, ill. szolgáltató laboratóriumokban „szabvány szerint, vagy akkreditáltan” végzett eljárások között mindig is volt egyfajta különbség. Fogalmazhatunk úgy is, hogy a hivatalos laboratóriumokban alkalmazott eljárások bizonyos késéssel követték a kutatásban bevezetett és általánossá vált újdonságokat. De talán soha nem volt ez a késés ilyen nagyléptékű, mint amit ma megélünk. Fel kell tenni ezért a kérdést, hogy mi lehet ennek az oka.

A mikrobiológiában és különösen a környezethigiéné, közegészségügy területén teljesen jogos kíváncsi a maximális megbízhatóságra való törekvés, hiszen az emberi egészség a tét. Éppen ezért kell elfogadni azt a késést, amit az eljárások egyértelmű megbízhatóságának bebizonyosodása, a szabványosításhoz, validáláshoz stb. szükséges idő indokol. Ma ugyanakkor a környezet-mikrobiológusok jeles hányada véli úgy, hogy a szabványos eljárások bizonyos részének az alkalmazása - az eljárások ma már közismert hibái, időigénye miatt - nagyobb veszélyt, hibaforrást jelent, mint az új (molekuláris) eljárások - esetlegesen nem tökéletesen bizonyított megbízhatóságából eredő - veszélyek. Vagyis sokak véleménye szerint az új eljárások bevezetése már-már veszélyesen késik. Magam úgy vélem, hogy ezt a késést jelentős részben a nemtenyésztéses eljárások hihetetlen sebességű fejlődése okozza. A molekuláris biológia a kémiai analitika és az elektronika (számítástechnika) új eredményei szinergikusan egymásba épülve olyan sebességgel ontják az újabb és újabb eljárásokat, hogy megértésük és alkalmazásuk még az e téren edzett kutató felkészültségét is próbára teszi. Teljesen nyilvánvaló ugyanakkor, hogy hacsak nem bizonyosodik be egy korábbi eljárásról javíthatatlan hibája, kár elvetni a hasznos és értelmes információt adó hagyományos eljárásokat.

A legelsőként bemutatott kutatás esetében feltett kérdésre - kialakul-e az Óhalászi-Holt-Tiszában rétegzettség - tökéletesen megválaszol az a néhány MPN vizsgálat, amely kiegészíti a fizikai-kémiai méréseket. A vizsgálat kulcsa a precízen végzett rétegmintavétel: Úgy kellett vízmintát venni, hogy a lehető legkevésbé keverjük fel a vizet. E célra autó

ablakmosó szivattyúból alakítottunk ki megfelelően kicsi és jó teljesítményű mintavevőt. A mikrobaközösségek összetétele további MPN tesztekkel nagyobb mélységben is megismerhető lett volna (pl. nitrátredukáló / denitrifikáló MPN, fermentáló, SRB, metilotróf MPN meghatározások). Sajnos ezekre akkor nem volt lehetőségünk, de a rétegzettség kialakulásával kapcsolatos kérdésünk megválaszolásában nem is adtak volna lényegesen több információt, legfeljebb megerősítik az egyes kemoklineket. Többet információt adhatott volna a termelő szervezetek élettani csoportjainak nagyobb mélységű megismerése. Az MPN technika ebben viszont nem segíthet. Az egyes rétegekből vett vízminták membránszűrőn koncentrált sejttanyagának megfelelő kivonatára alapozott fotoszintetikus pigment kemotaxonómiai elemzés, vagy akár a citometriás elemzés a szakirodalomból ismert (Brotas és Plante-Cuny, 2003; Cottrell és mtsai, 2006), ma már meglehetősen gyakran alkalmazott eljárás. A foto(auto)tróf szervezetek körében a „plate count anomaly” mértéke, ill. pontosabban fogalmazva a tenyésztésbe vont és pontosan ismert szervezetek köre a „morfospécieszekhez” viszonyítva elenyésző (pl. eukarióta algák, cianobaktériumok). Különösen kevés fajt ismerünk az anerób (anoxigénikus) fototrófok csoportjaiból. Igaz, esetükben a morfológia sem segít nagyon sokat. Megjegyezzük, hogy más fotikus élőhelyek mintáinak teljes nukleinsav kivonáson alapuló vizsgálatában ma már gyakorta nyerünk fototróf klóncsoportokat, filospécieszeket, zömmel az ismert fajok nagyon távoli, nemtenyésztett rokonait.

A környezeti mikrobiológiában - a kutatási feladat függvényében - de ma is kellő mélységű és adekvát információt adhat az élettani csoportok tenyésztésére alapuló MPN technikák eredménye, amely bizonyos esetekben nukleinsav alapú eljárásokkal még csak nem is feltétlen helyettesíthető. Pl. a denitrifikáló csíraszám, SRB csíraszám molekuláris technikán alapuló becslésre csak nagyon bonyolultán végezhető el. E „polifiletikus” csoportokban még az egész csoportot átfogó funkciógén sem áll rendelkezésünkre. Tudomásul kell vennünk ugyanakkor, hogy az MPN eljárásokkal kapott eredmények értékelése során gyakorta fogunk az alkalmazott technikával megválaszolhatatlan, nagyobb mélységben feltárhatatlan területekre bukkanni. A mérő-szolgáltató laboratórium tudomásul veszi az alkalmazott eljárás korlátait, a kutató laboratóriumban megpróbálunk tovább lépni és más, adekvát módszerekkel közelebb jutni a feltáratlan kérdések megoldásához.

A tenyésztésre alapozott eljárások és a nemtenyésztéses közösségi nukleinsav kivonáson alapuló technikák segítségével nyerhető környezeti mikrobiológiai információ mélységét elemeztük második példánkban. A gyékény rizoplán vizsgálata során is kritikus kérdés a mintavétel. A rizoplán mikrobióta izolálásának módszerét Szabó (1974) munkája nyomán határoztuk meg, az alkalmazott technika szinte szabványosított mintavételt jelentett. A minta-

feldolgozás során a tenyésztési eljárásokban - rutinszerűen, mintegy „gondolkodás nélkül” - az aerób mintafeldolgozást, inkubálást választottuk. Az obligát anaerob szervezetek jó része így már a minta feldolgozása során az O₂ mérgező hatása miatt elpusztulhat. Alapvetően csak lelkiismeretünket nyugtatjuk meg azzal az érveléssel, hogy a gyökér - az aerenhima miatt - aerób környezet, és az oxigén még a felületét borító talajréteget is aerálja. Vagyis a rizoplán alapvetően aerób élőhely. A redox festékek alkalmazásával (Gregory és Hinsinger, 1999), ill. legutóbb mikroeletródák bevetésével végzett vizsgálatok ezt az érvelést nem támasztják alá. A gyökérfelület, sőt a gyökér (aktív) szállító szövetektől távolabb eső részei is lápi növények esetében a nap egy részében feltétlen anaeróbbá válnak. A gyökér-talaj határfelületen akár - 300 mV redox [elektród] potenciál érték (H referencia elektród) is jellemző lehet (Nikolausz és mtsai, 2008). Vagyis a rizoplán baktériumközösségek elemzésénél ugyanolyan létjogosultsága van a teljesen anaerób mintafeldolgozásnak és inkubálásnak is, mint az aeróbnak! A vonatkozó szakirodalomban csak az utóbbi években és csekély számban találhatunk erre példát (Gossner és mtsai, 2006; Vladár és mtsai, 2008).

A tenyésztési eljárás következő kritikus lépése a táptalaj összetételének és koncentráció viszonyainak megválasztása. Talán a legjobb választás a vizsgált közeg kivonatának, mint egy általános, az élőhelyre jellemző szervesanyag „koktélnak” a tápközegbe inkorporálása. Mi tőzeg kivonatot választottunk a gyékény rizóma jellemző kémiai alkatelemeivel (keményítő, oligopeptidok) kiegészítve. Általánosságban is elmondhatjuk, hogy a minta-közeg kivonatának bizonyos koncentrációban a táptalajba vonása a lemezelve mikrobák számát jelentősen növeli (Olsen és Bakken, 1987). Ugyanakkor az is tény, hogy az ilyen tápagar lemezekről izolált mikroorganizmusok szokatlanul nagy hányada pusztul el a fenntartás első időszakában (akár 80-90 %-uk is). A tápközegek szerves elektrondonor koncentrációja összességében 5-10 g L⁻¹ nagyságrendű szokott lenni (pl. húspepton agarok, B táptalaj, véres agar). Az elektrondonorok ilyen hozzáférhető koncentrációban csupán kevés környezeti mintában jellemzők, beleértve a gyékény rizoplánt is. Ha ennek csak tizedét, vagy huszadát alkalmazzuk (Balkwill és Ghiorse, 1985; Connon és mtsai, 2002) a tápközegben, máris zömében más „diverzitást” tudunk tenyészteni.

A teljes DNS kivonáson alapuló filospéciesz meghatározás módszere az előzőekben ismertetett tápközeg-választási gondokkal nem szembesít. Amint azt az eredmények mutatják, a tenyésztéssel nyert zömében obligát aerób, vagy fakultatív anaerób légző szervezetekkel szemben a 16S rDNS alapú filospéciesz elemzésben legnagyobb mértékben anaerób baktériumok domináltak. A táptalaj által kiválogatott kemoorgano-heterotróf eukarbofil mikrobák mellett a nemtenyésztési technikával kemolitotróf autotrófokat is kimutattunk. A „két diverzitás”

azonban egyetlen közös fajt sem tartalmazott. Miért? A legelső, ami eszünkbe ötlik, hogy a DNS kivonás során a Gram-pozitív endospóráképző *Bacillus* sejtek nem tárultak fel, főként az extrém rezisztens endospórák DNS-ét talán nem tudtuk kivonni. Találtunk ugyanakkor a klónok között spórás szulfátredukálót, de aktinobaktériumokat is. Az előbbi endospórát, míg az utóbbiak artrospórát képeznek. Nem tudhatjuk persze, hogy esetükben vegetatív sejtekből, vagy kitartó képletekből vontuk-e ki a nukleinsavat. Azt mindenesetre valószínűsíti e tény, hogy vegetatív *Bacillus* sejteknek fel kellett nyílniuk az alkalmazott sejtfeltáró körülmények között.

Szemben a táptalajok és a tenyésztési körülmények - sok évtizedes tapasztalat alapján - talán megbecsülhető, előre látható szelektivitásával, a PCR preferenciális amplifikációjából következő hibákat - tévedéseket még csak becsülni sem tudjuk. E munkával párhuzamosan végzett komposzt mikrobiológiai elemzéseink során pl. a komposztokban tenyésztéssel jellemzőként kimutatott termofil monospóras aktinobaktériumokat a közösségi DNS klónkönyvtárakban nem találtuk meg (pl. *Thermobifida* spp.). Még olyan esetekben sem találtuk meg, amikor komposztmintáinkat helyenként porszerű fehéres bevonatként szabad szemmel is láthatóan borította az aktinobaktériumok spóratömege (Székely és mtsai, 2008). Ez esetben a PCR primerek „in silico” ellenőrzése (megvizsgáltuk, hogy az RDP adatbázisban a primerek hány 16S rRNS bázissorrenddel hibridizálnak illeszkedési hiba nélkül, vagy 1, ill. 2 illeszkedési hibával) nyilvánvalóvá tette, hogy az aktinobaktériumok miért nem voltak megtalálhatók a klónkönyvtárban: a forward primerünk e szervezetek zöme esetében 1-2 illeszkedési hibát mutatott. A gyékény rizoplán baktériumközösségének vizsgálatában az általunk alkalmazott reverz primer illeszkedési hibája oka lehetett a *Bacillus* fajokkal szembeni szelektivitásnak. Nagyon sánta analógiával azt mondhatjuk, hogy a tenyésztés esetén a táptalajok jól ismert szelektivitása helyébe a közösségi nukleinsav alapú vizsgálatoknál a PCR primerek szelektivitása lép. Ez utóbbit azonban ma még csak kevéssé ismerjük, kevéssé tudjuk a hatását megbecsülni. Természetesen már leírt fajok, jól ismert taxonok vizsgálata esetén az RDP adatbázisban in-silico előre elvégzett primer illesztés segítségével, vagy célzottan tervezett pontosan illeszkedő primerek használatával ez a gond megoldható. Hangsúlyozni kell, hogy az eddig még ismeretlen diverzitás feltárásában ez az eljárás nem jöhet szóba. Ahogyan azt a preferenciális PCR elemzése során javasoltuk, a megoldást több különböző primerpár, enzim módszer alkalmazása jelentheti.

A teljes RNS kivonásra alapozott filospéciesz vizsgálat legnagyobb meglepetésünkre egy „harmadik diverzitást” adott. Ez esetben csak könnyen tenyészthető baktériumok RNS-ét mutattuk ki, méghozzá az átlagos növények gyökérkörzetében a tenyésztési eljárások szerint

egyébként közönségesen jellemző *Pseudomonas* dominanciával. Őszi mintáinkban az *Acinetobacter* fajok jellegzetes előfordulása is egybeesett a tenyésztés eredményével. A közösségi reverz transzkripció - bár ma már rendelkezésünkre állnak „elfogadott” kitek erre a célra - torzítását becsülni sem tudjuk. Modellkísérletek e téren - tudomásunk szerint - még nem történtek. Tény, hogy rRNS-ből egy-egy aktív anyagcserét folytató sejtben jóval több van, mint az 1-10 kópiában jellemző rDNS-ből. Egy RNS alapú filospéciesz kimutató módszer emiatt *elvben* 10^2 - 10^4 nagyságrenddel érzékenyebb, mint a DNS alapú eljárás (ha feltételezzük, hogy a reverz transzkripció minden RNS molekulát cDNS-sé konvertál). Ennek ellenére nem valószínű, hogy vizsgálatunkban az eddig láthatatlan, minor fajokat tártuk volna fel. Ennek ellentmond a kloroplasztisz RNS-ek hiánya is a klónok között. Az is feltűnő még, hogy egynéhány *Nocardioidea simplex* klón kivételével csupa Gram-negatív szervezetet tudunk detektálni.

A sejtfeltárás és az RNS kinyerés hibáját talán elvethetjük, hiszen volt eset, hogy ugyanazt a mintát dolgoztuk fel DNS és RNS szinten. Igaz, hogy az RNS-ek stabilitása sokkal csekélyebb, mint a DNS-é (Alm és Stahl, 2000). Az alkalmazott eljárásban ezt azonban figyelembe vettük. A megoldást talán az rRNS-ek G + C molarányának különbségeiben és a 16S rRNS-ek eltérő másodlagos és harmadlagos szerkezetében kereshetjük. Az e területen felmerült kérdések megoldása még várat magára.

A gyékény rizoplán három (illetve a metanogén szervezetek vizsgálatával együtt négy) „különböző diverzitásának” együttes értelmezésével jutunk a legközelebb a közösségi anyagcsere megértéséhez. Látnunk kell azonban, hogy a nemtenyésztési eljárás sokszorta összetettebb és valóságosabb képet ad a mikroba-közösségekről, mint a tenyésztési. Meggyőződésem ennek ellenére, hogy a különböző tenyésztési és nemtenyésztési eljárások tág spektrumának együttes alkalmazása adhatja az általános környezet-mikrobiológiai diverzitás vizsgálatok esetében az elemzett élőhely „legnagyobb felbontású képét”.

Üdítő példa e tekintetben az antarktisi Vosztok-tó évezredek óta jéggel borított vizének, jég-víz határfelületen kialakult "biofilmjeinek" vizsgálata. A nemzetközi összefogással végzett elemzésben a legkülönbözőbb tenyésztési és nemtenyésztési technikákat együttesen alkalmazzák. Kétségtelen, hogy a hihetetlenül nagy erőforrásokat koncentráló munka tenyésztési eredményeinek a zöme a mintavételt követően 5-10 évvel kezdett megjelenni (Christner és mtsai, 2001). Teljesen más megközelítést alkalmaz Craig Venter óceánkutató programja. Nem tenyésztenek, viszont a vízmintákból kinyert DNS-t a lehető legnagyobb arányban - BAC klónokra alapozva - bázissorrend elemzésnek vetik alá (metagenome sequencing). Az eredmény egy szinte 90 %-ban ismeretlen világot tár elénk. Annak ellenére,

hogy a fajdiverzitás szinte ismeretlen marad (csak új filospécieszek sokaságát észlelik), a közösségi anyagcsere sok aspektusa feltárul (Yooseph és mtsai, 2007) a DNS bázissorrendekben kimutatott egyes gének funkcionális homológjainak keresése, ill. észlelése révén. Az eredményeket a mintavételt követő fél-egy évvel már publikálni kezdték. Vagyis – kellő bázissorrend elemzési kapacitást feltételezve – a közösségi 16S rDNS alapú filospéciesz diverzitás elemzés nagyon gyors technika.

A számunkra rendelkezésre álló anyagi lehetőségeket - azt gondolom - 100 %-ig kihasználva a gyékény rizoplán mikróba közösség nagy mélységű funkcionális megismerése vált lehetővé. Mégis, akár a gyékény rizoplán vizsgálatát, akár a két „nagy projekt” példáját nézzük, valójában egyetlen minta, vagy egynéhány független minta nagy mélységű vizsgálatát végeztük - végezték el, mintegy pillanatfelvételt adva egy élőhelyről. A vizsgálatok az adott élőhelyről sem idő-, sem pedig térbeli skálán nem adnak információt. A gyékénynél maradvány némi bepillantást nyertünk a nyári és őszi rizoplán mikrobióta különbségébe. Kellő számú ismétlés híján nem tudhatjuk, hogy a detektált változás tényleg a növény megváltozott anyagcseréjével függ-e össze, vagy valami más, számunkra ismeretlen ok van a háttérben. És hol van akkor még a napszakos változások nyomon követése. A térbeli heterogenitást illetően munkánk azt példázza, hogy nem tudtuk elkülöníteni az aerób és anaerób mikrokörnyezeteket. Talán nem is választható szét (Johnson és mtsai, 1997). De feltehetjük a kérdést, hogy vajon a gyökércsúcs és az attól 3 - 5 cm-re levő fiatal gyökérfelszín mikrobiótája azonos-e. Feltehetően nem válaszolunk rosszul, ha azt mondjuk, hogy nem.

Térben és időben nagyszámú minta elemzésében segítenek az ujjlenyomat eljárások. Nagyon kis térfogatú minta esetében a nukleinsavakra alapozott módszerek alkalmazhatók. Legalább 1 - 5 g minta vételének lehetősége megnyitja az utat a kemotaxonómiai markerek elemzésének. Amint a kellő gyakorisággal felvett állóképek gyors levetítésével mozgóképet kapunk, az egymást követő ujjlenyomat vizsgálatok eredményeinek értelmezésével is a mikróba közösségek tér - időbeli dinamikus változását tárhatjuk fel. Hangsúlyozni kell, hogy az ujjlenyomat technikák a környezeti mikrobiológiában használt kémiai paramétereknél sokszorta nagyobb mélységű betekintést tesznek lehetővé egy - egy élőhely működésébe, hiszen közvetlen információt adnak a filotípusok mennyiségi, ill. aktivitásbeli változásairól, még ha fajokat nem is mindig tudunk megnevezni.

Az ujjlenyomat eljárások különösen hasznosak az alkalmazott mikrobiológiai problémák megoldásában. Három példát mutattunk be az eredmények fejezetben. Mindhárom esetben nagyszámú mintával dolgoztunk és - egy esetben feltétlen - az idő szorításában is. Ráadásul akár az iszaprothasztó, akár a nitrifikáló rendszert tekintjük, a kulcsszervezetek tenyésztés-

tése nem, vagy csak nagyon nehezen oldható meg. Bár az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén rendelkezünk anaerób tenyésztő rendszerrel, a PRAS (pre-reduced, anaerobically sterilized) tápközegek előállítása felszerelés és munkaigényes, és a metanogének egyszerű „lemezelése” még az anaerób rendszerben sem oldható meg. Tiszta tenyészetek előállításában a határhígítási tápleves technika lenne alkalmazható, sok különböző tápközzel.

A nitrifikálók tenyésztése, noha aerób körülmények között zajlik, hasonlóan bonyolult. A kemolitotróf autotrófok csak szerves anyag mentes levesben, vagy szilikagél közegen tenyészthetők. Saját korábbi dunai vizsgálataink (Salem, 1997) eredménye ráadásul azt mutatta, hogy a kétévi munkával nyert 30 törzs zöme (kétharmada) oligokarbofil, vagy H_2 autotróf fakultatív nitrifikáló volt (pl. *Xanthomonas* fajok, *Hyphomicrobium zavarzinii*, és egy új *Hyphomicrobium* faj). Ilyen esetekben tehát a mintaszám és a tenyésztés okozta nehézségek áthidalására ideális megoldás az ujjlenyomat eljárások alkalmazása.

Az iszaprothasztó mikroba közösségeinek feltárása kapcsán Magyarországon elsőként tudtuk a metanogén Archaea közösség összetételének változását kimutatni a reaktorhőmérséklet változtatása hatására. A reaktorok jellemzésére alkalmazott kémiai paraméterek változásait a közösségi dinamika átalakulása pontosan megmagyarázta. A rothasztó, mint fekete doboz, feltárult az alkalmazott molekuláris technikák segítségével. Különösen érdekes látnunk a közösségi DNS és RNS alapú filospéciesz mintázatok különbségeit. Nyilvánvalóvá vált, hogy az RNS filospéciesz mintázat érzékenyebb, gyorsabb indikátora a történéseknek (Márialigeti és mtsai, 2006). Több Archaea faj autökológiájának ismeretében tetten érhattük a jelenlét/aktivitás (DNS/RNS) különbségeit. Nagyon jól egészítette ki a nem nukleinsav alapú ujjlenyomat vizsgálat a rendszer működéséről nyert ismereteket. Ez is megerősíti azt a véleményt, hogy a különböző nemtenyésztési technikák kombinálása átfogóbb képet ad a közösség-szerveződésről. A rothasztó tenyésztési technikákkal történő hasonló léptékű, mélységű vizsgálata megoldhatatlan feladat. Felhívom a figyelmet arra a már a gyékény rizoplán vizsgálatánál tapasztalt tényre, hogy a feltárt mikrobiális diverzitás nagy része eddig még tenyésztésbe nem vont szervezetekből tevődött össze.

A rothasztott iszap csurgaléklé kezelésére épített kísérleti nitrifikációs rendszer jellemzésére végzett vizsgálatok az előző munkák fényében - első pillantásra - csak az elemzett mikrobák (a nitrifikálók) tekintetében különböznek. Lényeges különbséget jelent azonban az, hogy az ammónia oxidálók közösségeinek változását nem a 16S rDNS alapján mutattuk ki, hanem egy funkciógén filogenetikai elemzésére alapozva. Az ammónia-monooxygenáz enzim, amely az ammónia oxidáció legelső lépését katalizálja e filogenetikailag homogén csoportban, egyedi és több vizsgálat fényében is a csoporttal együtt evolválódott (Rotthauwe és

mtsai, 1997). Vagyis az AmoA és a 16S rDNS koevolúciós rendszere az ammónia oxidálók esetében lehetővé tette, hogy az AmoA-t mind funkció, mind pedig faji affiliáció tekintetében értékeljük. Több hasonló nagyobb élettani csoportokra jellemző funkciógént is ismerünk (pl. a metanogének metil-koenzimM-reduktáza; az autotróf pro- és eukarióták több csoportjában a ribulóz-biszfoszfát-karboxiláz), azonban pont az autotróf nitrifikálók másik csoportja (a nitrit oxidálók) esetében ez a lehetőség nem áll rendelkezésünkre.

Az ún. funkciógének felhasználása a nemtenyésztéses molekuláris vizsgálatokban a taxonspecifikus (16S rDNS alapú) megközelítés mellett, ill. helyett lényeges előrelépést jelent a közösségi anyagcsere megismerésében. Ez esetben ugyanis nem a filogenetikai hovatartozás alapján következtetünk a lehetséges anyagcserére, hanem pontosan az elemzett anyagcsere folyamat (esetünkben nitrifikáció) kulcsenzimének géndiverzitását mutatjuk ki és a kérdéses anyagcsere egyes genotípusaihoz rendeljük hozzá a fajt. A funkciógén diverzitás vizsgálata taxonómiai tekintetben tág és nagyon szűk csoportokat is felölelhet. Az elsőre jó példa metanogének polifiletikus együttese, míg az utóbbira akár az autotróf ammónia oxidálók köre is példa lehet. E csoportból csak nagyon kevés fajt írtak le eddig (összesen 15-öt). Saját munkánk köréből kiemelném még a BTEX vegyületek lebontásában kulcsenzim katekol-1,2-dioxigenáz enzim és a BTEX bontó *Rhodococcus* fajok koevolúciójának kimutatását, ill. a *catA* gén alapú *Rhodococcus* identifikáció lehetőségének bemutatását (Táncsics és mtsai, 2008). Egy nemzetség pár fajának gyors pontos kimutatását teszi lehetővé a funkció oldaláról.

A funkciógének vizsgálata a nemtenyésztéses eljárások egy olyan újabb irányzatát jelentik, amelyik segítségével egyes környezetek közösségi anyagcseréjébe látunk bele a tenyésztésen alapuló eljárásokkal nem, vagy csak nagyon hosszasan kivitelezhető közvetett módon. Megjegyezzük, hogy ilyen elemzések elvégzésénél különösen is figyelni kell a horizontális géntranszfer lehetősége miatt a kérdéses genetikai információ elhelyezkedésére, mobilitására.

A parti szűrés elemzésével csupán azt kívántuk demonstrálni, hogy (a megbízás furcsaságai következtében rendelkezésre álló) nagyon rövid idő alatt (2007. szeptember 15 - december 15.) milyen részletes képet alkothattunk a kútvíz minőségének meghatározásában kritikus kavics-biofilm mikroba közösségéről. (A kutatás eredményeként választ tudunk adni egyébként a víztechnológus - e munkában nem tárgyalt - olyan kérdéseire, hogy pl. csökkenő ivóvíz igény esetén érdemes-e kutakat teljesen leállítani, vagy csak a kitermelt víz mennyiségét kell csökkenteni; a tisztítás, javítás után újra üzembe állított kút vizét mikor érdemes/szabad a hálózatba táplálni?). Itt is felhívom a figyelmet arra, hogy egy ilyen többször,

nagyon sokak által vizsgált, „hétköznapi” környezetben a filospéciesz identifikáció megint új fajok tömkelegét valószínűsítette.

Az előzőekben bemutatott és értékelt eredmények feltehetően mindenkit meggyőztek a nemtenyésztéses eljárások hasznáról a környezeti mikrobiológiai feladatok esetében. A módszerek elterjedésének - amint azt már többször említettem - mégis egyik lényeges gátját jelenti az egyes technikák megbízhatóságának, hibáinak viszonylagos ismeretlensége, szemben a tenyésztésre alapuló metodikáéval. A nemtenyésztéses eljárások mikróba közösségek elemzésére történő felhasználásának alapvető - elvi - korlátját jelenti, hogy eredetileg taxon, vagy génspecifikus eljárásokat kísérünk meg megfelelő módosításokkal „fekete dobozok” feltárásában alkalmazni. A PCR optimálás technikáját pl. vegyes nukleinsav állományból 1-2 gén-szakasz szaporítására kísérletezték ki. Hasonlóképpen a T-RFLP, vagy DGGE stb. eljárások esetében előzőleg nagy mélységben elemzett és jellemzett rendszerek - általában előre megjósolható - változásait követik (pl. mutáció elemzés, baktériumfertőzések diagnosztikája). A molekuláris klónozás technikáját úgyszintén egy-egy gén szaporítására, kifejezésére dolgozták ki. Emiatt nyilvánvaló, hogy a közösségi nukleinsav elemzési eljárásokban a módszerek nem minden esetben az elvárt módon működnek. Munkáink során mi magunk is szembesültünk ezeknek az eljárásoknak a hibáival, ezért azután a nemtenyésztéses eljárások technológiai sorrendjének megfelelően haladva górcső alá vettük az egyes folyamatokat: PCR, T-RFLP, DGGE. Megjegyzem, hogy a klónozás hibáival kapcsolatos vizsgálataink eredményeit is hamarosan közöljük. A bemutatott (alkalmazott) környezeti mikrobiológiai elemzésekben természetesen már figyelembe vettük a dolgozatban bemutatott eredményeket.

A nemtenyésztéses környezeti mikrobiológiai vizsgáló eljárásokról több kézikönyv jelent már meg, igen neves szerzők tollából. Sajnálattal kell megállapítanunk, hogy e munkák nem sok figyelmet fordítanak az eljárások alapvető hibáinak ismertetésére. A területre vonatkozó információtömeg nagyon gyors változásán túl feltehetően azért, mert a hibák egy jó része akár kifejezetten műszer specifikus. A technikai eszközök validálásának is teljesen új módszereit kell kifejleszteni az általános alkalmazhatósághoz. E munkák már megindultak és a hagyományos, valamint a nemtenyésztéses eljárások nagy vizsgálatszámú történő párhuzamos alkalmazása a molekuláris technikák elterjedését segítheti (Felföldi és mtsai, 2008).

A nemtenyésztéses diverzitás-vizsgálatok eredményeként egyre többször kapunk a tudományra nézve ismeretlen filospécieszeket. Sok esetben a környezeti mikrobiológiai kutatómunkának mára gátjává vált az ismert fajok hiánya. Ahogyan a dolgozat szakirodalmi áttekintésében írtam 5498 hivatalosan leírt faj (amelynek típusörzse gyűjteményekben elérhető) áll szemben a becsült 1 milliónyi ismeretlennel (8. lap). Kulcsfontosságú lenne

minél több új fajt leírni, anyagcsere képességeiket „autökológiai vizsgálatokban” megismerni. Az eredmények között ezért mutatok be egy legutóbb végzett polifázikus fajleírást. (Borsodi és mtsai, 2008). Az új fajok leírása és pontos laboratóriumi vizsgálata teszi lehetővé, hogy környezetünk rejtett erőforrásait minél teljesebben megismerjük és a társadalom szolgálatába állíthassuk.

Pusztán az International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology folyóirat évről évre gyarapodó cikkszámja is jelzi a területen megindult munkát. Jogosan vethető fel azonban a kérdés, hogy meddig tarthatók meg a fajleírással kapcsolatban 1980-ban (Skerman és mtsai, 1980) kötelezővé tett elvek. Különösen is lehet-e mondjuk 1 millió faj, fajonként csak átlagosan 10-10 törzsét (10 millió törzstenyészet) törzsgyűjteményekben fenntartani és egyáltalán szükséges-e? A választ több irányban is keresik. A kutatók egy része amellet törzslándzsát, hogy csak a „történelemformáló” fajokat (pl. tífusz, sörélesztő, *Thermus aquaticus*) kellene a gyűjteményekben fenntartani. Persze ki gondolta 1969-ben, hogy ez a Gram-negatív szervezet 20 - 30 év múlva milyen fontossá válik a molekuláris biológiában? A kutatók másik része molekuláris biológiai megoldásokat javasol: csak az egyes fajok genetikai információját „arhiváljuk”, a fenotípus a környezeti génkészletekre alapozva bármikor rekonstruálható lesz. „Brave new world” ... of system biology.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

„Te nagy konyhádba helyzéd embered,
S elnézed néki, hogy kontárkodik,
Kotyvaszt, s magát Istennek képzei.”
(*Madách Imre: Az ember tragédiája*)

A nemtenyésztéses diverzitásvizsgáló molekuláris eljárások 1980-90-es évektől kezdődő kidolgozása és elterjedése a környezeti mikrobiológia robbanásszerű fejlődését tette lehetővé. Az Eötvös Egyetem Mikrobiológiai Tanszékén lehetőségünk volt - némi késéssel, - de adaptálni, alkalmazni és tovább is fejleszteni ezeket az eljárásokat és mára felszereltségben Nyugat-európai és amerikai laboratóriumok szintjére fejlődni, még ha (anyagi) lehetőségeink sok téren szűkebbek is ezen intézményekénél (pl. elemzett bázisszám terén). Talán nem túlzás úgy fogalmaznom, hogy hazánkban a molekuláris diverzitáselemző vizsgálatok legtágabb skáláját alkalmazva végzünk környezeti bakteriológiai alap és alkalmazott kutatásokat. A disszertációban bemutatom azt a fejlődést, amelyet a környezeti bakteriológia a diverzitás kutatásban a tenyésztésre alapozott csíraszámbecsléses eljárások alkalmazásától a nemtenyésztéses módszerek különböző felbontású technikáival nyert adatgyűjtésig bejárt. A molekuláris eszköztár hasznának kritikus elemzését adom a legtágabban értelmezett különféle magyarországi vizes élőhelyek biodiverzitásának feltárása alapján. Az ELTE Mikrobiológiai Tanszék környezeti bakteriológiai kutatásai során alkalmaztuk hazánkban először a teljes környezeti nukleinsav kivonásra (DNS / RNS) épülő filospéciesz diverzitás meghatározást. Elsőként használtuk a környezeti mikrobiológiai diverzitáskutatásban a DGGE és a T-RFLP ujjlenyomat eljárásokat, valamint a közösségi lipid profil elemzéseket is. Az évek során kialakult egy, a polifázikus elvet valló baktérium taxonómiai műhely.

A tenyésztésre alapozott hagyományos csíraszámbecslési eljárásokkal nyerhető bakteriális diverzitásadatok hasznát az Óhalászi-Holt-Tisza esetében vizsgáltuk. Kimutattuk a víztest nyári és téli (jég alatti) rétegzettségének kialakulását, az epi- és hipolimnion eltérő baktériumközösségeit, amelyek a rétegződés jellegzetes vízkémiai paramétereit létrehozzák. Rámutattunk az alkalmazott mikrobiológiai eljárások korlátaira.

A pangóvízes területeken jellemző keskenylevelű gyékény rizoplán baktériumközösségeit (tenyésztéssel és izolálással nyert) törzsek vizsgálatára alapozva és teljes nukleinsav kivonásra épülő diverzitásvizsgálattal is elemeztük. A tenyésztés, a DNS és az RNS alapú elemzés „három különböző diverzitást” eredményezett. A vizsgált élőhely valós diverzitási és közösségi anyagcsere viszonyait nagy mélységben a nemtenyésztéses eljárásokkal tárhattuk

fel. Megállapítottuk, hogy több technika párhuzamos alkalmazásával, és elsősorban a molekuláris eljárások ésszerű bővítésével (pl. több „univerzális” primer használata) a rizoplán gradiensterének finomszerkezete is megismerhető.

A molekuláris ujjlenyomat eljárások segítségével - relatíve költségkímélő módon - rövid idő alatt térben és időben eltérő minták sokasága elemezhető. A metodika hasznát alkalmazott bakteriológiai munkákban mutattuk be. Egy szennyvíziszap rothasztó Bacteria és Archaea közösségeinek elemzése megmutatta a teljes környezeti DNS, ill. RNS kivonásra alapozott vizsgálatok eltérő hasznát. Az RNS alapú filospéciesz elemzéssel a mintavétel pillanatában aktív baktériumokat detektáljuk, míg DNS alapon a közeg fajkészletéről kapunk információt. A közösségi lipid profil analízisek a közösségben a legnagyobb aktív sejttömeggel jelenlévő mikroorganizmusok élettani csoportjainak a feltárására nyújtanak lehetőséget. Egy kísérleti nitrifikáló rendszer elemzésével továbbá, a filogenetikai információt is tartalmazó "funkciógének" (esetünkben az *AmoA*) vizsgálatának fontosságára hívtuk fel a figyelmet.

A parti szűrésért felelős Dunai biofilmek baktériumközösségeinek elemzésével demonstráltuk, hogy a molekuláris eljárások célszerű megválasztásával a kutatásra rendelkezésre álló igen rövid idő alatt (három hónap) - sok minta elemzésére alapozva - a közösségekről korábban elképzelhetetlen mélységű információ nyerhető.

Míg a tenyésztési eljárások hibái, hiányosságai közismertek, a nemtenyésztési technikák torzításait csak most tárjuk/ják fel. A közösségi PCR modellezésével bizonyítottuk a primer illeszkedési problémák közösségszerkezet torzító hatását. A primerkötődési hőfok és a ciklusszám, valamint az egyes baktériumok genomi tulajdonságainak elemzésére alapozva ajánlásokat fogalmaztunk meg a közösségi (multitemplát) PCR tervezéséhez. Az ajánlások hasznosságát rizoplán minták elemzésére alapozva igazoltuk.

A nemtenyésztési ujjlenyomat eljárások köréből a DGGE-t elemeztük mélyebben. Munkánk eredménye rámutatott, hogy a denaturáló gradiens gélelektroforézisben a sávmintázat kialakulása nagyon komplex folyamat. Az egyes sávokból történő DNS izolálásra alapozott filospéciesz meghatározás eredményét csak párhuzamosan végzett további elemzésekkel megerősítve szabad domináns közösségalkotó fajként megnevezni.

Az ELTE Mikrobiológiai Tanszéken végzett taxonómiai munka eredményét egy egész sorozat új faj leírása jelzi. A *Bacillus aurantiacus*-t a modern polifázikus szisztematikai elv szem előtt tartásával determináltuk. A természet biológiai-mikrobiológiai erőforrásainak megismerése és felhasználása az új fajok tiszta tenyészeinek genetikai és ökofiziológiai elemzésére alapozva, valamint környezeti előfordulásuk, technológiai szerepük molekuláris eszközökre alapozott mély feltárásával történhet.

VIII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

16 / 18S rRNS / rDNS	a riboszóma kis alegységi RNS molekula, ill. az azt kódoló gén prokariótákban / eukariótákban
ai-	anteizo, zsírsavak szénláncában, az utolsó előtti második szénatomon metil csoport található
AODC	acidine orange direct count, fluoreszcens festéssel történő sejtszámolás
ARB	a latin arbor = fa szóból, a Müncheneri Műszaki Egyetem nukleinsav bázissorrendre épülő törzsfaszerkesztő programcsomagja
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool – fehérje aminosav sorrend, ill. nukleinsav bázissorrend illesztésére, hasonlóságon alapuló adatbázis keresésére szolgáló program
bp	bázispár = 1 nukleotidpár a DNS kettős spirálban, használják egy-szálú nukleinsav 1-1 nukleotidjára is (pl. RNS esetén)
ci-	ciklopropil, zsírsavakban a szénláncban ciklopropil gyűrű fordul elő
DGGE	denaturáló gradiens gélelektroforézis
DSM	DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
G + C %	a genom guanin + citozin, ill. adenin + timin bázis aránya
GC	gas chromatography, gáz kromatográfia
HPLC	high performance liquid chromatography, nagyfelbontású (nagynyomású) folyadék kromatográfia
i-	izo-, zsírsavak szénláncában az utolsó előtti szénatomon metilcsoport található
IC	inorganic carbon, szervetlen szén
Kb	kilobázis = 1000 nukleotid
K _M	Michaelis állandó, az enzimek szubsztrát affinitásának jellemzője
KOI	kémiai oxigénigény
LB	Luria-Bertani agar, vagy leves (húskivonat - pepton tápközeg)
Mb	megabázis = 10 ⁶ nukleotid

MPN	most probable number, határhígítással megállapított legvalószínűbb csíraszám
MS	mass selective, molekulatömeg alapján elkülönítő analitikai kémiai eljárás
NASBA	nucleic acid sequence based amplification, izotermális nukleinsav szaporító eljárás
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
OTU	operational taxonomic unit – számításba vont taxonómiai egység
PCR	polimerase chain reaction, polimeráz láncreakció
Pg	petagram = 10^{15} g
PGPR	plant growth promoting rhizobacterium, növényi növekedést serkentő gyökérbaktérium
RDP	ribosomal database project, riboszómális nukleinsav adatbázis
RWCS	relative water column stability, a rétegzett vízoszlop stabilitását jellemző érték
SRB	sulfate reducing bacteria, szulfátredukáló baktériumok
SSC	single saline citrate, DNS oldó puffer
S _{SM}	simple matching similarity, hasonlóság számítási eljárás a csoportelemzésben
TAE	tris acetát EDTA puffer
TBE	tris borát EDTA puffer
TC	total carbon, összes szén
TKE	telepképző egység
TN	total nitrogén, összes nitrogén
TOC	total organic carbon, összes szerves szén
T-RF	terminális restrikciós fragmens
T-RFLP	terminális restrikciós fragmens elemzés
TSA	tryptic soy agar, tripton-szója agar
UPGMA	unveighed pair group method of arithmetic averages, egyszerű átlag számításra alapuló csoportképző eljárás a csoportelemzésben
UV-VIS	ultraibolya és látható fény
v.	változat, verzió

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- 201/2001. (X. 25.) Kormányrendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről. Magyar Közlöny, 2001/118, 8188-8236.
- Acinas, S.G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., Polz, M.F. 2005. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8966-8969.
- Agnew, M.D., Koval, S.F., Jarrell, K.F. 1995. Isolation and characterization of novel alkaliphiles from bauxite-processing waste and description of *Bacillus vedderi* sp., nov., a new obligate alkaliphile. *Syst. Appl. Microbiol.*, 18, 221-230.
- Alföldi, L., Oláh, J., Póka, T. 1995. A biológiai aktivitás bizonyosságai a Szentendrei-sziget kavicsos vízáradójában. *Hidr. Közl.*, 75, 163-171.
- Alm, E.W., Stahl, D.A. 2000. Critical factors influencing the recovery and integrity of rRNA extracted from environmental samples: use of an optimised protocol to measure depth-related biomass distribution in freshwater sediments. *J. Microbiol. Methods*, 40, 153-162.
- Altschul, S.F., Madden, T.I., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database research programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Amakata, D., Matsuo, Y., Shimono, K., Park, J.K., You, C.S., Matsuda, H., Yokota, A., Kawamukai, M. 2005. *Mitsuaria chitosanitabida* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, chitosane producing member of the „Betaproteobacteria”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1927-1932.
- Amann, R., Schleifer, H.-H. 2001. Nucleic acid probes and their application in environmental microbiology. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W. (Eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd Ed., Vol. 1. Springer, New York, pp. 67-82.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. 1990.a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1919-1925.
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A. 1990.b. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bact.*, 172, 762-770.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.
- Andreasen, K., Nielsen, P.H. 1997. Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3662-3668.
- Aragno, M., Schlegel, H.G. 1999. The mesophilic knallgas bacteria. In: Dworkin M. (Ed.) *The Prokaryotes*. 3rd On-line Ed. Springer-Verlag, New-York, Chapter 15, www.pryokaryotes.com
- Arth, I., Frenzel, P. 2000. Nitrification and denitrification in the rhizosphere of rice: the detection of process by a new multi-channel electrode. *Biol. Fertil. Soil.*, 31, 427-435.
- Bai, Q.Y., Zelles, L. 1997. A method for determination of archaeal ether-linked glycerolipids by high performance liquid chromatography with fluorescence detection as their 9-anthroyl derivatives. *Chemosphere*, 35, 263-274.
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods*, 55, 541-555.
- Baldani, J.I., Olivares, F.L., Hamerly, A.S., Reis Jr., F.B., Oliveira, A.L.M., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Reis, V.M., Döbereiner, J. 1997. Nitrogen fixing endophytes: recent advances

- in the association with graminaceous plants grown in the tropic. In: Elmerich, C., Kondorosi, Á., Newton, W.E. (Eds.) Biological nitrogen fixation for the 21st century: Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation. Springer, Paris, pp. 203-205.
- Balkwill, D.L., Ghiorse, W.C. 1985. Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 580-588.
- Bardgett, R.D., Hobbs, P.J., Frostegård, Å. 1996. Changes in soil fungal : bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol. Fert. Soils*, 22, 261-264.
- Bárdosi, E., Nagy, S., Dévai, Gy., Grigorszky, I., Kiss, B., Végvári, P., Bancsi, I. 2000. Az oxigénviszonyok változatossága holtmedrek példáján. *Hidr. Közl.*, 80, 275–277.
- Baretto, S. 2004. The occurrence of silica scaled chrysophyte species (Heterokontophyta; Chrysophyceae and Synurophyceae) in Hungary, with special attention on their biogeography and ecology. PhD Thesis, Manuscript, Eötvös L. University, University of Copenhagen, Budapest, pp. 1- 153.
- Barrow, G.I., Feltham, R.K.A. 2003. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 351.
- Becker, S., Böger, P., Oehlman, R., Ernst, A. 2000. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4945-4953.
- Béja, O., Koonin, E.V., Aravind, L., Taylor, L.T., Seitz, H., Stern, H.L., Bensen, D.C., Feldman, R.A., Swanson, R.V., DeLong, E.F. 2002. Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1731-1737.
- Bisby, F.A., Roskov, Y.R., Ruggiero, M.A. Orrell, T.M., Paglinawan, L.E., Brewer, P.W., Bailly, N., Hertum van, J. (Eds.) 2007. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2007 Annual Checklist. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2007/, Species 2000, Reading, UK.
- Blight, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method for lipid extraction for use in determining vitamin E – lipid ratios. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- Bobbie, R.J., White, D.C. 1980. Characterization of benthic microbial community structure by high resolution gaschromatography of fatty-acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 1212-1222.
- Bodelier, P.L.E., Libochant, J.A., Blom, C.V.P.M., Laanbroek, H.J. 1996. Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaption of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4100-4107.
- Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., Top, E.M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 39, 101-112.
- Boon, P.I., Virtue, P., Nichols, P.D. 1996. Microbial consortia in wetland sediments: a biomarker analysis of the effects of hydrological regime, vegetation and season on benthic microbes. *Mar. Freshw. Res.*, 47, 27-41.
- Borneman, J., Skroch, P.W., Osullivan, K.M., Palus, J.A., 1966. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1935-1943.
- Borsodi, A.K., Makk, J., Rusznyák, A., Vajna, B., Taba, Gy., Márialigeti, K. 2007. Phenotypic characterization and molecular taxonomic studies on *Bacillus* and related isolates from *Phragmites australis* periphyton. *Aquat. Bot.*, 86, 243-252.
- Borsodi, A.K., Márialigeti, K., Szabó, G., Palatinszky, M., Pollák, B., Kéki, Zs., Kovács,

- A.L., Schumann, P., Tóth, E.M. 2008. *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 845-851.
- Borsodi, A.K., Micsinai, A., Kovács, G., Tóth, E., Schumann, P., Kovács, A.L., Böddi, B., Márialigeti, K. 2003. *Pannonibacter phragmitetus* gen. nov., sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium isolated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 555-561.
- Borsodi, A.K., Micsinai, A., Rusznyák, A., Vladár, P., Kovács, G., Tóth, E.M., Márialigeti, K. 2005. Diversity of alkaliphilic and alkalitolerant bacteria cultivated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *Microb. Ecol.*, 50, 9-18.
- Borsodi, A.K., Vladár, P., Rusznyák, A., Sipos, R., Tóth, E.M., Márialigeti, K. 2004. Application of BIOLOG metabolic and DGGE genotypic fingerprint methods for studying sediment bacterial communities of Hungarian soda lakes. In: Chroňáková, A., Kristoufek, V., Elhottová, D., Malý, D. (Eds.) *Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates. Proc. 9th Methodological Workshop, Institute of Soil Biology, CAS, České Budějovice*, pp. 123-136.
- Boschker, H.T.S., Nold, S.C., Wellsburg, P., Bos, D., De Graaf, W., Pel, R., Parkes, R.J., Capenberg, T.E., 1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers. *Nature*, 392, 801-805.
- Bothe, J., Jost, G., Schlöter, M., Ward, B.B., Witzel, K.P. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 673-690.
- Bourain, D., Renquin, L., Grubisic, S., Scheldeman, P., Belay, A., Wilmotte, A. 2002. Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* (*Spirulina*) (Cyanophyceae, Cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30-year old dried samples from Africa. *J. Phycol.*, 38, 384-393.
- Breznak, J.A. 2004. Invertebrates - Insects. In: Bull, A.T. (Ed.) *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington, pp. 191-203.
- Bronstein, M., Schutz, M., Hauska, G., Padan, E., Shahak, Y., 2000. Cyanobacterial sulphide-quinone reductase: cloning and heterologous expression. *J. Bacteriol.*, 182, 3336-3344.
- Brotas, V., Plante-Cuny, M.-R. 2003. The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities. *Acta Oecologica*, 24, S109-S115.
- Brunel, B., Janse, J.D., Laanbroek, H.J., Woldendorp, J.W. 1992. Effect of transient oxic conditions on the composition of the nitrate-reducing community from the rhizosphere of *Typha angustifolia*. *Microb. Ecol.*, 24, 51-61.
- Bull, A.T., Stach, J.E.M. 2004. An overview of biodiversity- Estimating the scale. In: Bull, A.T. (Ed.) *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington, pp. 15-28.
- Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 573-606.
- Calhoun, A., King, G.M. 1997. Regulation of root-associated methanotrophy by oxygen availability in the rhizosphere of two aquatic macrophytes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3051-3058.
- Carlton, J.T., Geller, J.B. 1993. Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science*, 261, 78-82.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V., Gasol, J.M., Joint, I., Rodriguez-Valera, F., Predos-Alio, C. 2002. Changes in Archaeal, bacterial, and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting method in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol.*, 4, 338-348.
- Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., McCully, J., Franklin, M. 1977. A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.*, 81, 461-466.

- Chandler, D.P., Fredrickson, J.K., Brockman, F.J. 1997. Effect of PCR template concentration of the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol. Ecol.*, 6, 475-482.
- Christner, B.C., Morley-Thompson, E., Thompson, L.G., Reeve, J.N. 2001. Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. *Env. Microbiol.*, 3, 570-577.
- Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2259-2261.
- Claus, D. 1992. A standardized Gram staining procedure. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 451-452.
- Coates, J.D. Ellis, D.J., Blunt-Harris, E.L., Gaw, C.V., Roden, E.E., Lovley, D.R. 1998. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1504-1509.
- Cohan, F.M. 2002. What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 457-487.
- Cohen Y., Jorgensen, B.B., Padan, E., Shilo, M., 1975. Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature*, 257, 489-491.
- Cohen, Y., Jorgensen, B.B., Revsbech, N.P., Poplawski, R. 1986. Adaptation to hydrogen sulphide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 398-407.
- Cohen, Y., Krumbein, W.E., Shilo, M., 1977. Solar Lake (Sinai) 2. Distribution of photosynthetic microorganisms and primary production. *Limnol. Oceanogr.*, 22, 609-620.
- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucl. Acids Res.*, 31, 442-443.
- Collins, M.D., Jones, D. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbial. Rev.*, 45, 316-354.
- Collins, M.D., Pirouz, T., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. 1977. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 100, 221-230.
- Colwell, R.R. 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. In: Iizuka, H., Hasegawa, T. (Eds.) *Culture collections of microorganisms*. University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 421-436.
- Connon, S.A., Giovannoni, S.J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3878-3885.
- Corder, C., Mercey, D., Benn, P. 2006. *Chlamydia trachomatis*. *Sex. Trans. Inf.*, 82 (suppl. 4), 10-12.
- Cottrell, M.T., Mannino, A., Kirchman, D.L. 2006. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 557-564.
- Cowan, S.T., 1978. *Dictionary of microbial taxonomy*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1- 285.
- Crosby, L.D., Criddle, C.S. 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity. *Biotechniques*, 34, 790-802.
- Cypionka, H., Widdel, F., Pfennig, N. 1985. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 31, 39-45.
- Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.-H., Wagner, M. 2001. In situ characterisation of *Nitrospira*-like nitrite oxidising bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5273-5284.

- Daley, R.J. 1979. Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: Uses, limitations and comparative accuracy. ASTM Special technical publication, No. 695, pp. 29-45.
- De Ley, J. 1970. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 101, 738-754.
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. Eur. J. Biochem., 12, 133-142.
- De Smedt, J., De Ley, J. 1977. Intra- and intergeneric similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. Int. J. Syst. Bacteriol., 27, 222-240.
- De Soete, G. 1983. A least squares algorithm for fitting additive trees to proximity data. Psychometrika, 48, 621-626.
- Dévai, Gy. 1997. A Tisza-tó két védett morotvájának (Csapói- és Óhalászi- Holt-Tisza) ökológiai alapállapot-felmérése és minősítése az élőlényegyüttesek szukcessziójával összefüggő változások megítéléséhez. Kézirat, Debrecen, pp. 1- 86.
- Dévai, Gy. 2000. Taxonómia. Előadási ábrák. Kézirat, Debrecen, pp. 1- 34.
- Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C. 2004. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In: Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M. Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. (Eds.) Molecular microbial ecology manual. 2nd Ed. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 809-838
- Döbereiner, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. Soil. Biol. Biochem., 29, 771-774.
- Duleba, M., Felföldi, T., Somogyi, B., Vajna, B., Vörös, L., Márialigeti, K. 2008. A balatoni pikoalgák diverzitásának vizsgálata molekuláris módszerekkel. Hidr. Közl., In Press.
- Dupré, J., O'Malley, M. 2007. Metagenomics and biological ontology. Study Phyl. Biol. Biomed. Sci., 38, 834-846.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.) 2006. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. III rd. Ed. Springer, New York, pp. 1-7218.
- Eady, R.R. 2001. The nitrogen-fixing bacteria. In: Dworkin M. (Ed.) The Prokaryotes. 3rd On-line Ed. Springer Verlag, New York, Chapter 22, www.prokaryotes.com.
- Eaton, A.D., Cleresci, L.S., Greenberg, A.E., Franson, M.A.H. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th Ed. APHA, Washington, pp. 1- 788.
- Egert, M., Friedrich, M.W. 2003. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol., 69, 2555-2562.
- Eggen, R., Harmsen, H., de Vos, W.M. 1990. Organisation of ribosomal RNA gene cluster from the archaeobacterium *Methanotheroxobacterium soehngenii*. Nucleic Acids Res., 18, 1306-1312.
- Emerson D.J., Weiss, J.V., Megonigal, J.P. 1999. Iron-oxidizing bacteria are associated with ferric hydroxide precipitates (Fe-plaque) on roots of wetland plants. Appl. Environ. Microbiol., 65, 2758-2761.
- Erola, E., Lehtonen, O.-P. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol., 26., 1745-1753.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid deoxybonucleic acid hybridisation in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridisation in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 224-229.
- Farrelly, V., Rainey, F.A., Stackebrandt, E. 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Appl. Environ. Microbiol., 61, 2798-2801.

- Fauque, G.D. 1995. Ecology of sulfate-reducing bacteria. In: Barton, L.L. (Ed.) Sulfate-reducing bacteria. Plenum Press, New York, pp. 217-241.
- Feigel, B.J., Knackmuss, H.J. 1993. Syntrophic interactions during degradation of 4-aminobenzenesulfonic acid by a two species bacterial culture. Arch. Microbiol., 159, 124-130.
- Felföldi, T., Heéger, Zs., Vargha, M., Márialigeti, K. 2008. Detection of potentially pathogenic bacteria in the drinking water distribution system of a hospital in Hungary. Clin. Microbiol. Infect., In Press.
- Felföldi, T., Somogyi, B., Márialigeti, K., Vörös, L. 2008. Duna-Tisza közí szikes tavak pikoplanktonjának molekuláris biológiai jellemzése. Hidr. Közl., In Press.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: maximum likelihood approach. J. Mol. Evol., 17, 368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39, 783-791.
- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequence interference and reliability. Annu. Rev. Genet., 22, 521-565.
- Felske, A., Rheims, H., Wolterink, A., Stackebrandt, E., Akkermans, A.D.L. 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. Microbiology, 143, 2983-2989.
- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Appl. Environ. Microbiol., 62, 340-346.
- Ferris, M.J., Ward, D.M. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol., 63, 1375-1381.
- Findlay, B.J., Clarke, K.J. 1999. Ubiquitous dispersal of microbial species. Nature, 400, 828.
- Findlay, R.H. 1996. The use of phospholipid fatty acids to determine microbial community structure. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., van Bruijn, F.J. (Eds.) Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 4.1.4, 1-17.
- Findlay, R.H., King, G.M., Walting, K. 1989. Efficacy of phospholipid analysis in determining microbial biomass in sediments. Appl. Environ. Microbiol., 55, 2888-2893.
- Forney, L.J., Zhou, X., Brown, C.J. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed kind. Curr. Opin. Microbiol., 7, 210-220.
- Frenzel, P., Bosse, U. 1996. Methyl fluoride, an inhibitor of methane oxidation and methane production. FEMS Microbiol. Ecol., 21, 25-36.
- Frostegård, Å., Courtois, S., Ramière, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., Simonet, P. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. Appl. Environ. Microbiol., 65, 5409-5420.
- Frund, C., Cohen, Y. 1992. Diurnal cycles of sulfate reduction under oxic conditions in cyanobacterial mats. Appl. Environ. Microbiol., 58, 70-77.
- Fujie, K., Hu, H.Y., Tanaka, H., Urano, K., Saitou, K., Katayama, A. 1998. Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of microbiota. Soil Sci. Plant Nutr., 44, 393-404.
- Fuseler, K., Cypionka, H. 1995. Elemental sulfur as an intermediate of sulfide oxidation with oxygen by *Desulfobulbus propionicus*. Arch. Microbiol., 164, 104-109.
- Garrity, G.M. 2001. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, pp. 1-3526.
- Gattinger, A. 2000. Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften in oxischen und anoxischen Bodenökosystemen anhand von Phospholipid-Profilen. Ph.D. Dissertation, Technischer Universität, München, pp.

- 1- 153.
- Gattinger, A., Schlöter, M., Munch, J.C. 2002. Phospholipid etherlipid and phospholipid fatty acid fingerprints in selected euryarchaeotal monocultures for taxonomic profiling. *FEMS Microbiol. Lett.*, 213, 133-139.
- Giovannoni, S.J. 1991. The polymerase chain reaction. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., (Eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley, New York, pp. 177-201.
- Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olson, G.J., Pace, N.R. 1988. Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for the identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.*, 170, 720-726.
- Goldfine, H., Langworthy, T.A. 1988. A growing interest in bacterial ether lipids. *Trends Biochem. Sci.*, 13, 217-221.
- Gomes, N.C.M., Heuer, H., Schonfeld, J., Costa, R., Mendonça-Hagler, L., Smalla, K. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil*, 232, 167-180.
- Gontang, E. A., Fenical, W., Jensen, P. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 3272-3282.
- Goodfellow, M., Manfio, G.P., Chun, J. 1997. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: Claridge, M.F., Dawah, H.A., Wilson, M.R. (Eds.) *Species: The units of biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp. 171-190.
- Gorzó, Gy., Reskóné Nagy, M., Kupainé Pálfi, K. 1998. A környezet anyagforgalmában résztvevő baktériumok. In: Némédi, L. (Ed.) *Környezetbakteriológia*. KGI, Budapest, pp. 83-86.
- Gossner, A.S., Kusel, K., Schulz, D., Trenz, S., Acker, G., Lovell, C.R., Drake, H.L. 2006. Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe *Clostridium intestinale* and the acetogen *Sporomusa rhizae* sp. nov. isolated from roots of the black needlerush *Iuncus roemerianus*. *Microbiology*, 152, 1209-1219.
- Govan, J.R., Hughes, J.S., Vandamme, P. 1996. *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. *J. Med. Microbiol.*, 45, 395-407.
- Gregory, P.J., Hinsinger, P. 1999. New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview. *Plant Soil*, 211, 1-9.
- Grigorszky, I., Nagy, S., Krienitz, L.K., Kiss, M., Hamvas, M., Tóth, A., Borics, G., Máthé, C., Kiss, B., Borbély, G., Dévai, G., Padisák, J. 2000. Seasonal succession of phytoplankton in a small oligotrophic oxbow and some consideration to the PEG model. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 27, 152-156.
- Grimont, F., Grimont, P.A.D. 2000. The genus *Serratia*. In: Dworkin, M. (Ed.) *The Prokaryotes*. 3rd On-line Ed. Springer Verlag, New York, Chapter 150, www.pryokaryotes.com.
- Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, M.P. 1981. The *Serratia liquefaciens* - *Serratia proteomaculans* - *Serratia grimesii* complex: DNA relatedness. *Curr. Microbiol.*, 5, 317-322.
- Grimont, P.A.D., Grimont, F., Desplaces, N., Tchen, P. 1985. DNA probe specific for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.*, 21, 431-437.
- Großkopf, R., Janssen, P.H., Liesack, W. 1998.a. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 960-969.
- Großkopf, R., Stubner, S., Liesack, W. 1998.b. Novel Euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in anoxic bulk soil of flooded rice microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4983-4989.
- Groth, I., Schumann, P., Rainey, F.A., Martin, K., Schietze, B., Augsten, K. 1997. *Demetria*

- terrigena* gen. nov. sp. nov., a new genus of actinomycetes isolated from compost soil. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 1129-1133.
- Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Martin, K., Rainey, F.A. 1996. *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov. a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell-wall. Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 234-239.
- Hackstein, J.H.P. 1997. Eukaryotic molecular biodiversity: systematic approaches for the assessment of symbiotic associations. Anton. Leeuw. Int. J. Gen. Mol. Microbiol., 72, 63-76.
- Halbritter, A., Mogyoróssy, T. 2002. Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis of rhizosphere bacterial communities in a peat soil. Agro. Talajt., 51, 123-128.
- Halbritter, A.A. 2005. Lápi növények rizoszféra baktériumközösségei, azok nitrogénkötő és oligonitrofil fajai. Doktori értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, Kézirat, pp. 1- 127.
- Haldane, J.B.S. 1949. Suggestions as to quantitative measurement of rates of evolution. Evolution, 3, 51-56.
- Hales, B.A., Edwards, C., Ritchie, D.A., Hall, G., Pickup, R.W., Saunders, J.R. 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol., 62, 668-675.
- Hansen, M.C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S. 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. FEMS Microbiol. Ecol., 26, 141-149.
- Harper, J.L., Hackworth, D.L. 1995. Preface. In: Hackworth, D.L. (Ed.) Biodiversity, measurement and estimation. Chapman and Hall, London, pp. 5-12.
- Hartmann, A., Lawrence, J.R., Aßmus, B., Schlöter, M. 1998. Detection of microbes by laser confocal microscopy. In: Akkermans, A.D.L. (Ed.) Molecular Microbial Ecology Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 4.1.10, 1-34.
- Hasegawa, T., Takizawa, M., Tanida, S. 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 319-322.
- Hey, J. 2001. The mind of the species problem. Trends Ecol. Evol., 16, 326-329.
- Hill, T.C.J., Walsk, K.A., Harris, J.A., Hoffett, B.F. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiol. Ecol., 43, 1-11.
- Hirashi, A., Morishima, Y., Takeuchi, J. 1991. Numerical analysis of lipoquinone patterns in monitoring bacterial community dynamics in wastewater treatment systems. J. Gen. Appl. Microbiol., 37, 57-70.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol., 33, 1225-1228.
- Hoef-Emden, K., Melkonian, M. 2003. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae); a combination of molecular phylogeny and morphology provides insight into a long-hidden dimorphism. Protist, 154, 371-409.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, S.T. Williams, S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th Ed. Williams and Willkins, Baltimore, pp. 1- 787.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., Kudo, T. 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. FEMS Microbiol. Lett., 221, 299-304.
- Horikoshi, K. 1996. Alkaliphiles – from an industrial point of view. FEMS Microbiol. Rev., 18, 259-270.
- Houwers, A., Akkermans, A.D.L. 1981. Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Netherlands. Plant Soil, 61, 189-202.
- Hu, H.-Y., Fujie, K., Urano, K. 1999. Development of a novel solid phase extraction method for the analysis of bacterial quinones in activated sludge with a higher reliability. J.

- Biosci. Bioeng., 87, 378-382.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, 180, 4765-4774.
- Huß, V.A.R., Festi, H., Schleifer, K.H. 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.*, 4, 184-192.
- Ishii, K., Fukui, M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3753-3755.
- Isolini, D., Hummerjohann, J., Roetschi, A., Berthond, H. 2007. Isolierung und charakterisierung von Mikroorganismen aus spontan gegährten Schweizer Rohwürsten. ALP Science, Bern, 508, 1-12.
- Janse, I., Bok, J., Zwart, G. 2004. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Meth.*, 57, 279-281.
- Jensen, M.A., Straus, N. 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods. Appl.*, 3., 186-194.
- Jenny, B., Isch, C., Aragno, M. 1989. Nitrogen fixation by new strains of *Pseudomonas pseudoflava* and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 35, 461-467.
- Johnson, M.S., Zhulin, I.B., Gapuzan, M.E., Taylor, B.L. 1997. Oxygen dependent growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.*, 179, 5598-5601.
- Johnson, S.A., Goddard, P.A., Iliffe, C., Timmins, B., Rickard, A.H., Rolson, G., Handley, P.S. 2002. Comparative susceptibility of resident and transient hand bacteria to para-chloro-meta-xenolol and triclosan. *J. Appl. Microbiol.*, 93, 336-344.
- Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W., Owenson, G.G. 1998. Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles*, 2, 191-200.
- Jorgensen, B.B. 1977. Bacterial sulfate reduction within reduced microniches of oxidized marine sediments. *Mar. Biol.*, 41, 7-17.
- Jukes, T.J., Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.) *Mammalian protein metabolism*. Vol. 3, Academic Press, New York, pp. 21-132.
- Kappelmeyer, U., Wießner, A., Kusch, P., Kästner, M. 2002. Operation of a universal test unit for planted soil filters - Planted Fixed Bed Reactor. *Eng. Life Sci.*, 10, 311-315.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Angelidaki, I. 2004. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 331-338.
- Katz, L.A. 2002. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1893-1900.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16, 111-120.
- King G.M. 1994. Association of methanotrophs with the roots and rhizomes of aquatic vegetation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3220-3227.
- King, G.M., Garey, M.A. 1999. Ferric iron reduction by bacteria associated with the roots of freshwater and marine macrophytes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4393-4398.
- Kisand, V., Wikner, J. 2003. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J. Microbiol. Meth.*, 54, 183-191.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1328-1333.
- Kliegler, M.J., Stowe, R.P., Obenhuber, D.C., Groves, T.O., Mishora, S.K., Pierson, D.L. 1992. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2089-2092.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by

- siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
- Kniemeyer, O., Probian, C., Rosello-Mora, R., Harder, J. 1999. Anaerobic mineralization of quaternary carbon atoms: isolation of denitrifying bacteria on dimethylmalonate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3319–3324.
- Kopczynski, E.D., Bateson M.M., Ward, D.M. 1994. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 746-748.
- Kovács, G. 2002. Klasszikus és molekuláris biodiverzitási vizsgálatok úszólápon növekedő keskenylevelű gyékény (*Typha angustifolia* L.) rizoplán baktérium-közösségén. Doktori értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, Kézirat, pp. 1-87
- Kovács, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., Márialigeti, K. 1999. *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 167-173.
- Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heilig, G.H.J., Stephen, J.R., Woldendorp, J.W. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 31, 207-215.
- Krekeler, D., Cypionka, H. 1995. The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17, 271-277.
- Kuske, C.R., Barns, S.M., Busch, J.D. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3614-3621.
- Kyselková, M., Kopecký, J., Felföldi, T., Čermák, L., Omelka, M., Grundmann, G.L., Moëne-Loccoz, Y., Ságová-Marečková, M. 2008. Development of a 16S rRNA gene-based prototype microarray for the detection of selected actinomycetes genera. *Anton. Leeuw.*, DOI 10.1007/s 10482-008-9251-z.
- Laczkó, E., Rudaz, A., Aragno, M. 1997. Diversity of antropogenically influenced or disturbed soil microbial communities. In: Insam, J., Rangger, A. (Ed.) *Microbial communities – Functional versus structural approaches*. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 57-67.
- Lalande, R., Bissonnette, N. Coutlée, D., Antoun, H. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil*, 115, 7-11.
- Lan, R., Reeves, P.R. 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol.*, 8, 396-401.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp. 115-147.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6955-6959.
- Lapage, S.P., Sneath, P.H.A., Lessel, E.F., Skerman, V.B.D., Seeliger, H.P.R., Clark, W.A. (Eds.) 1992. International code of nomenclature of bacteria (1990 Revision). *Bacteriological Code*. ASM, Washington, pp. 1- 232.
- Lee, N., Nielsen, P.H., Andreassen, K.J., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.-H., Wagner, M. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautography – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1289-1297.
- Lim, J.-M., Jeon, C.O., Kim, C.-J. 2006.a. *Bacillus taeanensis* sp. nov., a halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2903-2908.
- Lim, J.-M., Jeon, C.O., Lee, S.-M., Lee, J.C., Xu, L.-H., Jiang, C.-L., Kim, C.-J. 2006.b.

- Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, sporeforming bacterium isolated from a salt lake in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 373-377.
- Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4516-4522.
- Liu, Y., Balkwill, D.L., Aldrich, H.C., Drake G.R., Boone, D.R. 1999. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 545-556.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latreille, E., Lobry, C., Delgenes, J.P., Gödön, J.J. 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ. Microbiol.*, 8, 720-731.
- Lorenz, M.G., Wackernagel, W. 1994. Bacterial gene transfer by genetic transformation in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 58, 563-602.
- Loy, A., Lechner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.-H., Wagner, M. 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5064-5081.
- Lu, Y., Murase, J., Watanabe, A., Sugimoto, A., Kimura, M. 2004. Linking microbial community dynamics to rhizosphere carbon flow in a wetland rice soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48, 179-186.
- Ludwig, W., Klenk, H.-P. 2001. Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W. (Eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd Ed., Vol. 1. Springer, New York, pp. 49-65.
- Lueders, T., Friedrich, M.W. 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction length polymorphism analysis of small subunit *rRNA* and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 320-326.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.Y., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.K., Tiedje, J.M. 2001. The RDP-II. (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.*, 29, 173-174.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker Jr., C.T., Garrity, G.M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., Woese, C.R. 1999. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.*, 27, 171-173.
- Mandel, M. 1969. New approaches to bacterial taxonomy: perspective and prospects. *Annu. Rev. Microbiol.*, 23, 239-274.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D., Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 795-799.
- Márialigeti, K. 1996. A baktériumok ellentmondásos helye a biológiai sokféleségben. *Természet Világa*, II. különszám, pp. 58-61.
- Márialigeti, K., Berta, B., Gorál, R., Pohner, Zs., Székely, A.J., Tauber, T., Tóth, E.M. 2006. Use of molecular fingerprint techniques in the optimisation of sewage treatment biotechnologies. In Deák, T. et al. (eds.) *Proceedings of the 25th Annual meeting of the European Culture Collections Organisation*, Budapest, pp. 23-35.
- Marilley, L., Vogt, G., Blanc, M., Aragno, M. 1998. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant Soil*, 198, 219-224.

- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.*, 16, 47-51.
- Marmur, J., Lane, D. 1960. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: Biological studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46, 453-461.
- Marsh, T.L. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 323-327.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, P., Morrison, D. A., Bonlnois, G.J., Claverys, J.-P. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl. Acids Res.*, 20, 3479-3483.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, s., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Catroux, G. 2001. DNA extraction from soils. Old bias for new microbial analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2354-2359.
- Martins, R.F., Davids, W., Al-Soud, W.A., Levander, F., Radström, P., Hatti-Kaul, R. 2001. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. *Extremophiles*, 5, 135-144.
- Massol-Deya, A.A., Odelson, D.A., Hickey, R.F., Tiedje, J.M. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, A.D.L.O., van Elsas, J.D., van Bruijn, F.J. (Eds.) *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 3.3.2, 1-8.
- Mayr, E. 1976. *Evolution and the diversity of life. Selected essays*. Belknap Press / Harvard University Press, Cambridge (Mass.). pp. 1-721.
- Mesbah, M., Premachandran, U., Whitman, W.B. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 159-167.
- Micsinai A., Borsodi A.K., Csengeri V., Horváth A., Oravecz O., Nikolausz M., Reskóné N.M., Márialigeti K. 2003. Rhizome-associated bacterial communities of healthy and declining reed stands in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia*, 506-509, 707-713.
- Minnikin, D.E., Collins, M.D., Goodfellow, M. 1979. Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J. Appl. Bacteriol.*, 47, 87-95.
- Minnikin, D.E., Goodfellow, M. 1980. Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. In: Goodfellow, M., Board, R.G. (Eds.) *Microbiological classification and identification*. Academic Press, London, pp. 189-256.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.-L., Thomas, P., Ramirez, F., Casalot, L., Cayol, J.-L., Garcia, J.-L., Ollivier, B. 2004. *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 169-174.
- Molnár, I. 2005. A fenotípusok evolúciója. Hallgatói segédlet. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kézirat, Budapest, pp. 1- 30.
- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.*, 3, 371-394.
- Moreira, D., López-Garcia, P. 2002. The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends Microbiol.*, 10, 31-38.
- Mountfort, D., O'Brulla, J.W., Krumholz, L.R., Bryant, M.P. 1984. *Syntrophus buswellii* gen. nov., sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 216-217.
- MSZ 12739. 1978-1984. Felszíni vizek üledékének vizsgálata. MSZH, Budapest.
- MSZ 12749. 1993. Felszíni vizek minősége, minőségi jellemzők és minősítés. MSZH, Budapest.

- MSZ 12750. 1974. Felszíni vizek vizsgálata. MSZH, Budapest.
- MSZ 1484. 1992-2004. Vízvizsgálat. MSZH, Budapest.
- MSZ 21470-77. 1988. Környezetvédelmi talajvizsgálatok. MSZH, Budapest.
- MSZ 22902. 1990. Víztoxikológiai vizsgálatok. MSZH, Budapest.
- MSZ 260. 1955-1992. Szennyvizek vizsgálata. MSZH, Budapest.
- MSZ 318. 1979-1986. Szennyvíziszap vizsgálata. MSZH, Budapest.
- MSZ EN ISO 26461-2. 1994. Vízminőség. A szulfidredukáló anaerobok (*Clostridiumok*) spóráinak kimutatása és számlálása. 2. rész: membránszűrési módszer. MSZH, Budapest.
- MSZ EN ISO 6222. 2000. Vízminőség. Tenyésztető mikroorganizmusok számának meghatározása. Telepszám meghatározás agar táptalaj beoltásával. MSZH, Budapest.
- MSZ ISO 10260. 1993. Vízminőség. A biokémiai paraméterek mérése. Az a-klorofill-koncentráció spektrofotometriás meghatározása. MSZH, Budapest.
- Murray, R.G.E., Doetsch, R.N., Robinow, C.F. 1994. Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds.) Methods for general and molecular bacteriology. ASM, Washington, pp. 21-41.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol., 59, 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Anton. Leeuw. Int. J. Gen. Mol. Microbiol., 73, 127-141.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O., Jannasch, H.W. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Arch. Microbiol., 164, 165-172.
- Myers, R.M., Larin, Z., Maniatis, T. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA-DNA duplexes. Science, 230, 1242-1246.
- Nasri, M., Thomas, D. 1987. Alteration of the specificity of *PvuII* restriction endonuclease. Nucleic. Acids Res., 15, 7677-7687.
- Nielsen, P., Fritze, D., Priest, F.G. 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. Microbiology, 141, 1745-1761.
- Nikolausz, M., Kappelmeyer, U., Székely, A., Rusznyák, A., Márialigeti, K., Kästner, M. 2008. Diurnal redox fluctuation and microbial activity in the rhizosphere of wetland plants. Eur. J. Soil Biol., 44, doi:10.1016/j.esobi.2008.01.003
- Nikolausz, M., Márialigeti, K., Kovács, G. 2004. Comparison of RNA- and DNA-based species diversity investigations in rhizosphere bacteriology with respect to chloroplast sequence exclusion. J. Microbiol. Methods, 56, 365-373.
- Nikolausz, M., Palatinszky, M., Rusznyák, A., Richnow, H.-H., Kappelmeyer, K., Kästner, N. 2007. Novel approach using substrate-mediated radiolabelling of RNA to link metabolic function with the structure of microbial communities. FEMS Microbiol. Lett., 274, 154-161.
- Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A., Márialigeti, K. 2005. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. FEMS Microbiol. Lett., 244, 385-390.
- Nogi, Y., Takami, H., Horikoshi, K. 2005. Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: proposal of five novel species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 2309-2315.
- Normander, B., Prosser, J.I. 2000. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. Appl. Environ.

- Microbiol., 66, 4372-4377.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol., 178, 5636-5643.
- Ogram, A., Sayler, G.S., Barkay, T.J. 1987. DNA extraction and purification from sediments. J. Microbiol. Methods, 7, 57-66.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., Stahl, D.A. 1986. Microbial ecology and evolution. A ribosomal RNA approach. Annu. Rev. Microbiol., 40, 337-365.
- Olsen, R.A., Bakken, L.R. 1987. Viability of soil bacteria: Optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. Microb. Ecol., 13, 59-74.
- Oren, A., Padan, E., Avron, M. 1977. Quantum yields for oxygenic and anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 2152-2156.
- Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N., Inamori, Y. 2006. Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate reducing conditions by stable-isotope probing. Microbiol. Ecol., 52, 253-266.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N. 2000. An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environ. Microbiol., 2, 39-50.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, 276, 734-740.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.L., Olsen, G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. Adv. Microb. Ecol., 9, 1-55.
- Padisák, J. 2005. Általános limnológia. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, pp. 106-111.
- Padisák, J., Reynolds, C.S. 2003. Shallow lakes: The absolute, the relative, the functional and the pragmatic. Hydrobiologia, 506-509, 1-11.
- Palleroni, N.J. 1992. Introduction to family Pseudomonadaceae. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds.) The prokaryotes., 2nd Ed. Springer Verlag, Berlin, pp. 3069-3085.
- Pandey, A., Palni, L.M.S. 1997. *Bacillus* species: The dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. Microbiol. Res., 152, 359-265.
- Párista, É.K., Ács, É., Böddi, B. 2002. Chlorophyll-a determination with ethanol – a critical test. Hydrobiologia, 485, 191-198.
- Park, H.I., Choi, Y.J., Pak, D. 2005. Autohydrogenotrophic denitrifying microbial community in a glass beads biofilm reactor. Biotechn. Lett., 27, 949-953.
- Perna, N.T., Plunkett III, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grofbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature, 409, 529-533.
- Podani, J. 2001. Syn-tax 2000 computer programs for data analysis in ecology and systematics. Users Manual, Budapest, pp. 1- 125.
- Polz, M.F., Cavanaugh, C.M. 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl. Environ. Microbiol., 64, 3724-3730.
- Polz, M.F., Ott, J.A., Bright, M., Cowanough, C.M. 2000. When bacteria hitch a ride. ASM News, 66, 531-539.
- Pósfai, G., Plunkett III, G., Fehér, T., Frisch, D., Keil, G.M., Umenhoffer, K.,

- Kolisnychenko, V., Stahl, B., Sharma, S.S., Arruda de, M., Burland, V., Harcum, S.W., Blattner, F.R. 2006. Emergent properties of reduced genome *Escherichia coli*. *Science*, 312, 1044-1046.
- Primrose, A. 1976. Formation of ethylene by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 95, 159-165.
- Quin, X.Y., Wu, L.Y., Huang, H.S., McDonel, P.E., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., Zhou, J.Z. 2001. Evaluation of PCR-generated chimeras: mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 880-887.
- Rainey, F.A., Ward, N., Sly, L.I., Stackebrandt, E. 1994. Dependence on the taxon composition of clone libraries for PCR amplified, naturally occurring 16S rDNA, on the primer pair and the cloning system used. *Experientia*, 50, 796-797.
- Rajendran, N., Matsuda, O., Urushigawa, Y., Simidu, U. 1994. Characterization of microbial community structure in the surface sediment of Osaka-Bay, Japan, by phospholipid fatty acid analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 248-257.
- Reding, H.K., Hartel, P.G., Wiegel, J. 1991. Effect of *Xanthobacter*, isolated and characterized for rice roots on growth of wetland rice. *Plant Soil*, 138, 221-229.
- Rees, H.C., Grant, W.D., Jones, B.E., Heaphy, S. 2004. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods. *Extremophiles*, 8, 63-71.
- Rennie, R.J., de Freitas, J.R., Ruschel, A.P., Vose, P.B. 1982. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugarcane (*Saccharum* sp.). *Can. J. Microbiol.*, 28, 462-467.
- Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R. 1992. Differential amplification of ribosomal-RNA gene by polymerase chain-reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3417-3418.
- Rheims, H., Spröer, C., Rainey, F.A., Stackebrandt, E. 1996. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology*, 142, 2863-2870.
- Rifaat, H.M., Márialigeti, K., Kovács, G. 2000. Investigation on rhizoplane actinomycete communities of cattail (*Typha angustifolia*) from a Hungarian wetland. *Suo Mires*, 51, 197-203.
- Rifaat, H.M., Márialigeti, K., Kovács, G. 2002. Investigations on rhizoplane actinobacteria communities of papyrus (*Cyperus papyrus*) from an Egyptian wetland. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 49, 423-432.
- Romano, I., Lama, L., Nicolaus, B., Gambacorta, A., Giordano, A. 2005. *Bacillus saliphilus* sp. nov., isolated from a mineral pool in Campania, Italy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 159-163.
- Romsics, Cs., Márialigeti, K. 2008. Nukleinsav kinyerés elősegítése Retsch MM301 típusú sejtmalom (vibrációs rázó golyósmalom) használatával. *Labinfó*, 2008/2, 8-9.
- Ronaghi, M. 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.*, 11, 3-11.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 39-67.
- Rotthauwe, J.M., Witzel, K.P., Liesack, W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia oxidising populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4704-4712.
- Saikaly, P.E., Stroot, P.G., Oerther, D.B. 2005. Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 5814-5822.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Salem, A.M.A. 1997. N cycle associated facultative and obligate chemolithotrophic bacteria

- in Danube water and sediment. Szakdolgozat, Kézirat, pp. 1- 142.
- Sambrook, J.E., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York , pp. 1.1. - 18.125.
- Santegoeds, C.M., Muyzer, G., de Beer, D. 1998. Biofilm dynamics studied with microsensors and molecular techniques. Wat. Sci. Technol., 37, 125-129.
- Sato, K., Jiang, Y. 1996. Gram-negative bacterial flora on the root surface of wheat (*Triticum aestivum*) grown under different soil conditions. Biol. Fertil. Soils, 23, 273-281.
- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D.L., Saarela, M., de Vos, W.M. 2001. Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal *Bifidobacterium* populations in a prebiotic and probiotic feeding trial. Syst. Appl. Microbiol., 24, 227-231.
- Schleifer, K.-H., Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev., 36, 407-477.
- Schlöter, M., Zelles, L., Hartmann, A., Munch, J.-C. 1998. New quality of assessment of microbial diversity in arable soils using molecular and biochemical methods. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., 161, 425-431.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F., Tebbe, C.C. 2001. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. Appl. Environ. Microbiol., 67, 3557-3563.
- Schmalenberger, A., Tebbe, C.C. 2003. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. Mol. Ecol., 12, 251-261.
- Schmiedhuber, S., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. 1988. Construction of a DNA probe for the specific identification of *Streptococcus oralis*. J. Clin. Microbiol., 26, 1042-1044.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Appl. Environ. Microbiol., 64, 4870-4776.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C. 2000. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) – linking of 16S rRNA based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 66, 3556-3565.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., Uchiyama, H. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Biotechnol. Lett., 23, 1205-1208.
- Sentsova, O., Nikitina, K.A., Gusev, M.V. 1975. Characteristics of oxygen metabolism in the obligate phototrophic blue-green alga *Anabaena variabilis* in darkness. Mikrobiologia 44, 283-288.
- Shannon, C.E. 1948.a. A mathematical theory of communication. Bell Syst. Techn. J., 27, 379–423. Shannon, C.E. 1948.b. A mathematical theory of communication. Bell Syst. Techn. J., 27, 623–656. Shaw, N. 1975. Bacterial glycolipids and glycosphingolipids. Adv. Microb. Physiol., 12, 141-167.
- Simpson, J.M., McCracken, V.J., Gaskins, H.R., Mackie, R.I. 2000. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4705-4714.
- Sinigalliano, C.D., Kuhn, D.N., Jones, R.D. 1995. Amplification of the AmoA gene from diverse species of ammonium oxidising bacteria and from indigenous bacterial

- population from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2702-2706.
- Sipos, R., Székely, A.J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., Nikolausz, M. 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60, 341-350.
- Skerman, V.B.D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1- 516.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A. (Eds.) 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 225-420.
- Smibert, R.M., Krieg, N.R. 1994. Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds.) *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM, Washington, pp. 603-711.
- Smolander, A., Sundman, V. 1987. *Frankia* in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants. *Physiol. Plant.*, 70, 297-303.
- Sneath, P.H.A. 1972. Computer taxonomy. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Eds.) *Methods in microbiology*. Vol. 7.A. Academic Press, London, pp. 29-98.
- Sneath, P.H.A., 2001. Numerical taxonomy. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W. (Eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd Ed., Vol. 1. Springer, New York, pp. 39-42.
- Sogin, S.J., Sogin, M.L., Woese, C.R. 1971. Phylogenetic measurement in procaryotes by primary structural characterization. *J. Molec. Evol.*, 1, 173-184.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. Eds. 1981. *Biometry*. Ferrman, San Francisco, pp. 49-89.
- Speksnijder, A., Kowalchuk, G.A., De Jong, S., Kline, E., Stephen, J.R., Laanbroek, H.J. 2001. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 469-472.
- Stackebrandt, E. 1992. Unifying phylogeny and phenotypic properties. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds.) *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer, New York, pp. 19-47.
- Stackebrandt, E. 2004. Will we ever understad? The undescribable deversity of the prokaryotes. *Acta Micr. Immun. Hung.*, 51, 449-462.
- Stackebrandt, E. 2006. Defining taxonomic ranks. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. IIIrd Ed. Springer, New York, pp. 1, 29-57.
- Stackebrandt, E., Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, November 2006, 152-155.
- Stackebrandt, E., Fredericksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. 2002. Report on the ad-hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1043-1047.
- Stackebrandt, E., Göbel, B.M. 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNS sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846-849.
- Stackebrandt, E., Woese, C.R., 1984. The phylogeny of prokaryotes. *Microbiol. Sci.*, 1, 117-122.
- Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J., Pace, N.R. 1985. Characterization of Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1379-1384.
- Staley, J.T. 2004. Speciation and bacterial phylospecies. In: Bull, A.T. (Ed.) *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington, pp. 40-48.
- Staley, J.T., Castenholz, R.W., Colwell, R.R., Holt, J.G., Kane, M.D., Pace, N.R., Slyers,

- A.A., Tiedje, J.M. 1997. The microbial world: Foundation of the biosphere. AAM, Washington, pp. 1-32.
- Staley, J.T., Konopka, A. 1985. Measurement of in-situ activities of non photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.*, 39, 321-349.
- Staley, J.T., Krieg, N.R. 1984. Classification of prokaryotic organisms: an overview. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1-4.
- Stead, D.E., Sellwood, J.E., Wilson, J., Viney, I. 1992. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 315-321.
- Strunk, O., Ludwig, W. 1995. ARB a software for environmental sequence data. Department of Microbiology, Technical University of Munich, Germany.
- Stubner, S., Wind, T., Conrad, R. 1998. Sulfur oxidation in rice field soil: Activity, enumeration, isolation and characterisation of thiosulfate oxidising bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 21, 569-578.
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 625-630.
- Suzuki, M.T., Rappé, M.S., Giovannoni, S.J. 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4522-4529.
- Sváb, D. 2008. Preferenciális ligálás és annak közösségszerkezeti képet torzító hatásai mikrobaközösségek klónkönyvtár elemzése során. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Szakdolgozat, Kézirat, pp. 1-52.
- Szabó, I. M. 1988-1989. A bioszféra mikrobiológiája. I-III. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 1-2476.
- Szabó, I.M. 1974. Microbial communities in a forest-terrestrial ecosystem: the pattern of microbial communities. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 1-415.
- Szalma, E. 2003. Vízínövények életformája és élőhelyeik szerinti csoportosítása. PhD dolgozat, Debrecen, pp. 1-128.
- Székely, A.J., Sipos, R., Berta, B., Vajna, B., Hajdú, Cs., Márialigeti, K. 2008. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence aided T-RFLP profile of mature compost. *Microb. Ecol.*, 53, In press (MECO-2008-0097.R1).
- Takarada, H., Sekina, M., Kosugi, H., Matsuo, Y., Fujisawa, T., Omato, S., Kishi, E., Shimizu, A., Tsukatani, N., Tanikawa, S., Fujita, N., Hayama, S. 2008. Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *J. Bacteriol.*, 190, 4139-4146.
- Tamaoka, J., Komagata, K. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.*, 25, 125-128.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599.
- Táncsics, A., Szoboszlay, S., Kriszt, B., Kukolya, J., Baka, E., Márialigeti, K., Révész, S. 2008. Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX degrading *Rhodococcus* species. *J. Appl. Microbiol.*, 103, xxx-xxx. In press (doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03832.x).
- Tauber, T., Berta, B., Székely, A.J., Gyarmati, I., Kékesi, K., Márialigeti, K., Tóth, E.M. 2007. Characterisation of community structure of bacteria in parallel mesophilic and thermophilic pilot scale anaerobe sludge digesters. *Acta Microbiol. Imm. Hung.*, 54, 47-55.
- Tejeda-Mohica, E.A. 1993. A paradicsom (*Lycopersicum esculentum*) kecskeméti merev

- szárú varietásza rizoplán baktériumközösségének vizsgálata. Egyetemi doktori értekezés. Kézirat. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, pp. 1-134.
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G., Ramsing, N.B. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1405-1415.
- Teszárné Nagy, M. 2006. Az Óhalászi-Holt-Tisza (Kiskörei-tározó) rétegzettségének hidroökológiai jelentősége. Doktori értekezés. Kézirat. Debreceni Egyetem, Debrecen, pp. 1-131.
- Teszárné Nagy, M., Márialigeti, K., Végvári, P., Csépes, E., Bancsi, I. 2003. Stratification analysis of the Óhalász Ox-bow of the river Tisza (Kisköre Reservoir, Hungary). *Hydrobiologia*, 506–509, 37–44.
- Teszárné Nagy, M., Márialigeti, K., Végvári, P., Csépes, E., Bancsi, I. 2005. A jég alatti rétegzettség vizsgálata az Óhalászi-Holt-Tiszán. *Hidr. Közl.*, 85, 144–146.
- Tiedje, J.M. 1995. Approaches to the comprehensive evaluation of prokaryotic diversity of a habitat. In: Alsopp, D., Colwell, R.R., Hawksworth, D.L. (Eds.) *Microbial diversity and ecosystem function*, CABI Publishing, Wallingford, pp. 73-87.
- Tornabene, T.G. 1985. Lipid analysis and the relationship to chemotaxonomy. In: Gottschalk, G. (Ed.) *Methods in microbiology*. Vol. 18. Academic Press, London, pp. 209-234.
- Torsvik, V. 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 12, 15-21.
- Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A., Øvreas, L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.*, 64, 53-62.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L. 1990.a. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 782-787.
- Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T.F. 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296, 1064-1066.
- Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R., Goksoyr, J. 1990.b. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 776-781.
- Tóth, E.M., Kéki, Zs., Homonnay, Z.G., Borsodi, A.K., Márialigeti, K., Schumann, P. 2008. *Nocardioides daphniae* sp. nov. isolated from *Daphnia cucullata* (Crustacea: Cladocera). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 000-000 (DOI 10.1099/js. O. 65305-0).
- Tóth, E.M., Tauber, T., Kovács, H., Bohus, V., Borsodi, A.K., Révész, S., Márialigeti, K. 2004. Evaluation of biodiversity by respiratory quinone (RQ) and phospholipid fatty acids (PLFA) analysis in different soils and sediments. In: Chroňáková, A., Křišťůfek, V., Elhottová, D., Malý, S. (Eds.) *Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates*. Institute of Soil Biology, CAS, České Budějovice, pp. 31-37.
- Tóth, J., Almási, I. 2001. Interpretation of observed fluid potential patterns in a deep sedimentary basin under tectonic compression: Hungarian Great Plain, Pannonian basin. *Geofluids*, 1, 11-36.
- Tourova, T.P., Antonov, A.S. 1987. Identification of microorganisms by rapid DNA-DNA hybridisation. *Methods Microbiol.*, 19, 333-355.
- Török, J.K., Pollák, B., Heéger, Zs., Csikós, Gy., Márialigeti, K. 2008. First evidence of bacterial endosymbionts in the lobose testate amoeba *Arcella* (Amoebozoa, Arcellinida). *Protistology*, 5, xxx-xxx. Accepted.
- Van der Gon, D.H.A.C., Neue, H.U. 1996. Oxidation of methane in rhizosphere of rice plants. *Biol. Fert. Soil.*, 22, 359-366.
- Van Elsas, J.D., Smalla, K., Tebbe, C.C. 2000. Extraction and analysis of microbial community nucleic acids from environmental matrices. In: Jansson, J.K., van Elsas,

- J.D., Bailey, M.J. (Eds.) Tracking genetically engineered microorganisms. Enrekah, Austin, Texas, pp. 29-51.
- Van Outryve, M.F., Gosselé, F., Kersters, K., Swings, J. 1988. The composition of the rhizosphere of chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi). Can. J. Microbiol., 34, 1203-1208
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev., 60, 407-438.
- Varga, Z., Papp, L., Dévai, Gy. 1997. Általános zootaxonómia. In: Papp, L. (Ed.) Zootaxonómia. Egységes jegyzet. MTM - Dabas Jegyzet, Dabas, pp. 11-22.
- Vellai, T., Kovács, A.L., Kovács, G., Ortutay, Cs., Vida, G. 1999. Genome economization and a new approach to the species concept in bacteria. Proc. Roy. Soc. B. Biol. Sci., 266, 1953-1958.
- Velten, S., Hammes, F., Boller, M., Egli, T. 2007. Rapid and direct estimation of active biomass on granular activated carbon through adenosine tri-phosphate (ATP) determination. Wat. Res., 41, 1973-1983.
- Venter, C.J., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.C., Ransch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fonts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., Smith, H.O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sergasso Sea. Science, 304, 66-74.
- Versalovich, J., Schneider, M., de Bonijn, F.J., Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell. Biol., 5, 25-40.
- Vladár, P., Rusznyák, A., Márialigeti, K., Borsodi, A.K. 2008. Diversity of sulphate-reducing bacteria inhabiting rhizosphere of *Phragmites australis* in Lake-Velencei (Hungary) revealed by a combined cultivation based and molecular approach. Microb. Ecol., 56, 64-75.
- Vladár, P., Vajna, B., Borsodi K.A., Márialigeti, K. 2004. Genus level DGGE analysis for species of Desulfovibrionaceae derived from reed samples of a Hungarian soda lake. In: Chroňáková, A., Krišťufek, V., Elhottová, D., Malý, D. (Eds.) Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates. Proceedings of the 9th Methodological Workshop, Institute of Soil Biology, AS CR., České Budějovice, pp. 97-101.
- von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev., 21, 213-229.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J., Amann, R. 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. Wat. Sci. Technol., 34, 237-244.
- Wang, G.C.Y., Wang, Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules is a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. Appl. Environ. Microbiol., 63, 4645-4650.
- Ward, D.M., Bateson, M.M., Weller, R., Ruff-Roberts, A.L. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous microorganisms in a natural community. Nature, 345, 63-65.
- Wasserfallen, A., Nolling, J., Pfister, P., Reeve, J., Conway de Macario, E. 2000. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic Methanobacterium isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 43-53.
- Watanabe, I., Furusaka, C. 1980. Microbial ecology of flooded rice soils. In: Alexander, M.

- (Ed.) Advances in microbial ecology. Plenum, New York, 4, 125-168.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. The structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737-738.
- Watson, S.W., Novitsky, T.J., Quinby, H.L., Valois, F.W. 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 940-946.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüper, J.G. 1987. Report on the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 463-464.
- Weidner, S., Arnold, W., Puhler, A. 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 766-771.
- Welsh, J., McClelland, M. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucl. Acids Res.*, 19, 5275-5279.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., Bobbie, R.J. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 40, 51-62.
- Whitehead, T.R., Cotta, M.A. 1999. Phylogenetic diversity of methanogenic Archaea in swine waste storage pits. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179, 223-226.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6578-6583.
- Widmer, F., Fließbach, A., Laczkó, E., Schulze-Aurich, J., Zeyer, J. 2001. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and BIOLOG analysis. *Soil. Biol. Biochem.*, 33, 1029-1036.
- Willems, A., de Vos, P., de Ley, J. 2000. The Genus *Comamonas*. In: Dworkin, M. (Ed.) *The Prokaryotes 3rd On-line Ed.* Springer Verlag, New York, Chapter 132, www.pryokaryotes.com.
- Wilson, E.O. 1992. *The diversity of life.* Belknap Press / Harvard University Press, Cambridge (Mass.). pp. 1-424.
- Wilson, K.H., Wilson, W.J., Radosevich, J.L., DeSantio, T.Z., Viswanathan, V.S., Kuczmarski, T.A., Andersen, G.L. 2002. High density microarray of small subunit ribosomal DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2535-2541.
- Wind, T., Conrad, R. 1997. Localization of sulfate reduction in planted and unplanted rice field soil. *Biogeochem.*, 37, 253-278.
- Wind, T., Stubner, S., Conrad, R. 1999. Sulfate reducing bacteria in rice field soil and on rice roots. *System. Appl. Microbiol.*, 22, 269-279.
- Woese, C.R. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8742-8747.
- Woese, C.R. 2006. How we do, don't and should look at bacteria and bacteriology. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria.* III. Ed. Springer, New York, pp. 1, 3-23.
- Woese, C.R., Fox, G.E. 1977. The phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5088-5090.
- Woese, C.R., Fox, G.E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B.J., Stahl, D. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 254, 83-96.
- Woese, C.R., Sogin, M.L., Sutton, L.A. 1974. Prokaryote phylogeny I: Concerning the relatedness of *Aerobacter aerogenes* to *Escherichia coli*. *J. Molec. Evol.*, 3, 293-299.
- Woods, D.E., Sokol, P.A. 2000. The genus *Burkholderia*. In: Dworkin, M. (Ed.) *The*

- Prokaryotes 3rd On-line Ed. Springer Verlag, New York, Chapter 283, www.pryokaryotes.com.
- Wu, L., Thompson, D.K., Li, G., Hurt, R.A., Tiedje, J.M., Zhou, J. 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5780-5790.
- Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, 8, 313-323.
- Yamada, K., Komagata, K. 1972. Taxonomic studies on coryneform bacteria. IV. Morphological, cultural, biochemical, and physiological characteristics. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 399-416.
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H. 2005. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi Subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 7493-7503.
- Yang, C-H., Crowley, D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 345-351.
- Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D.B., Halpern, A.L., Williamson, S.J., Remington, K., Eisen, J.A., Heidelberg, K.B., Manning, G., Li, W., Jaroszewski, L., Cieplak, P., Miller, C.S., Li, H., Mashiyama, S.T., Joachimiak, M.P., van Belle, C., Chandonia, J.-M., Soergel, D.A., Zhai, Y., Natarajan, K., Lee, S., Raphael, B.J., Bafna, V., Friedman, R., Brenner, S.E., Godzik, A., Eisenberg, D., Dixon, J.E., Taylor, S.S., Strausberg, R.L., Frazier, M., Venter, J.C. 2007. The *Sorcerer II* Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families. *PLOS Biology*, 5, J. DOI:10.1371/journal. Pbio. 0050018
- Zelles, L. 1996. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopolysaccharides. In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.) *Methods in soil biology*. Springer Verlag, Berlin, pp. 80-93.
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils*. 29, 111-129.
- Zelles, L., Bai, Q.Y. 1993. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 495-507.
- Zelles, L., Bai, Q.Y., Beck, T., Beese, F. 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agriculture soils. *Soil Biol. Biochem.*, 24, 317-323.
- Zöld-Balogh, Á. 1999. Szulfátredukáló baktériumok vizsgálata a Ráckeve-Soroksári Dunaág szigetcsépi holtágának úszólápján. Szakdolgozat, Kézirat, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, pp. 1-57.
- Zuckerkindl, E., Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.*, 8, 357-366.